

LIYA REGINA MIKAMI

**VARIABILIDADE DOS EXONS 2 E 4 DO GENE *BCHE* E SUA
RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DA
BUTIRILCOLINESTERASE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal do Paraná,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, na área de Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleidi A. Chautard-Freire-
Maia

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo L. R. de Souza

Curitiba
2005

LIYA REGINA MIKAMI

**VARIABILIDADE DOS EXONS 2 E 4 DO GENE *BCHE* E SUA
RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DA
BUTIRILCOLINESTERASE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal do Paraná,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, na área de Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleidi A. Chautard-Freire-
Maia

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo L. R. de Souza

Curitiba
2005

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À querida Prof^a. Eleidi A. Chautard-Freire-Maia, pela orientação, apoio, carinho e amizade.

À Prof^a. Oksana Lockridge do Instituto Eppley, do Centro Médico da Universidade do Nebraska (Omaha, Nebraska, USA), por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação, ensinamentos nos experimentos de expressão gênica e auxílio financeiro.

Ao Prof. Ricardo L.R. de Souza, por ser não apenas meu co-orientador, mas também ter sido meu apoio, meu amigo, meu “quebra-galho”.

Ao Dr. Lawrence Schopfer, pela orientação nos experimentos de cinética enzimática e pela grande hospitalidade com que me recebeu no Instituto Eppley. Aos colegas de laboratório da UFPR, pela amizade e convivência harmoniosa, em especial à Neluce pela extração do DNA e à Izolde pela lavagem do material.

Aos colegas de laboratório do Instituto Eppley, pela hospitalidade, paciência e amizade demonstradas durante minha estada, Ellen Duysen, Bin Li, He Li e, em especial, à Stacy Wieseler por ter me ensinado os protocolos de expressão gênica.

Aos meus queridos amigos por estarem presentes quando precisei, em especial, à Cristina e à Savana.

Aos meus queridos tios Lucia e Alberto, aos meus primos Junior, Luziadne, Emy, Mitsuo, Oriane e Carol por acreditarem sempre em mim.

À minha família, Mônica, Donizete, Eduardo e Thaís por estarem sempre comigo.

À CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche.

Aos meus pais, Nair e Masanari, por tudo o que sou e consegui.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXIII
RESUMO.....	XXV
ABSTRACT	XXVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Aspectos gerais.....	4
2.2. Origem das colinesterases	5
2.3. Estrutura da BChE.....	6
2.4. Função fisiológica da BChE.....	12
2.5. Atividade da BChE.....	13
2.6. Nomenclatura.....	14
2.7. Variabilidade genética do loco <i>BCHE</i>	15
2.7.1. Variante <i>D70G</i>	18
2.7.2. Variante <i>A539T</i>	19
2.7.3. Variante <i>E497V</i>	19
2.7.4. Variantes <i>T243M</i> e <i>G390V</i>	19
2.7.5. Variante <i>V142M</i>	20
2.7.6. Variante <i>A184V</i>	20
2.7.7. Variantes silenciosas	21
2.8. Variantes raras e determinação da atividade.....	21
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Material.....	23
4.1.1. Amostra da população	23
4.1.2. Variantes detectadas em outros estudos.....	23
4.2 Metodologia.....	24
4.2.1 Fenotipagem do loco <i>CHE2</i> - Eletroforese em gel de ágar ácido	24
4.2.2 Atividade da BChE.....	24

4.2.3. Detecção de variantes do gene <i>BCHE</i>	26
4.2.3.1. Extração do DNA	26
4.2.3.2. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	27
4.2.3.2.1. PCR – Exon 2	27
Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA na técnica de SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)	28
4.2.3.2.2. PCR – Exon 4	29
4.2.3.3. Análise do DNA amplificado	29
4.2.3.3.1. SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)	29
4.2.3.3.2. Coloração do gel	31
4.2.3.3.3. SSCA para a diferenciação das mutações <i>T243M</i> e <i>E255D</i>	31
4.2.3.4. Sequenciamento de DNA	32
4.2.3.4.1. Purificação do DNA	32
4.2.3.4.2. Reação de sequenciamento	34
4.2.4. Expressão gênica	35
4.2.4.1. Mutagênese sítio-dirigida para as mutações <i>K12R</i> , <i>G75R</i> , <i>V294M</i> , <i>G333C</i> e <i>R470W</i>	35
4.2.4.1.1. PCR em duas etapas (<i>two steps PCR</i>)	35
A. PCR	35
B. Purificação do produto amplificado	38
4.2.4.1.2. Digestão do produto amplificado	38
4.2.4.1.3. Gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP = <i>low melting point</i>)	38
4.2.4.1.4. Reação de ligação	38
4.2.4.1.5. Transformação	40
4.2.4.2. Mutagênese sítio-dirigida para as mutações <i>E90D</i> e <i>I99M</i>	40
4.2.4.2.1. Reação de PCR	41
4.2.4.2.2. Digestão do DNA parental por <i>DpnI</i>	41
4.2.4.2.3. Transformação	41
4.2.4.3. Extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina	42
4.2.4.4. Digestão para verificação da presença do inserto	43
4.2.4.5. Amplificação do DNA plasmidial	43
4.2.4.6. Purificação do DNA plasmidial	43
4.2.4.7. Dosagem do DNA	45
4.2.4.8. Sequenciamento do gene <i>BCHE</i> contendo as mutações	45
4.2.4.9. Transfecção	45
4.2.4.9.1. Transfecção em células 293T	45
4.2.4.9.2. Transfecção em células de ovário de hamster chinês (CHO)	46
4.2.4.10. Atividade da BChE variante	47
4.2.4.11. Determinação do K_m para butiriltiocolina (BTC)	47
4.2.4.12. Titulação com clorpirifos-oxon (CPO)	49
4.2.4.13. <i>Western blot</i> para a variante sem atividade	51
4.2.4.13.1. Gel de poliácridamida em gradiente 4-30%	51
4.2.4.13.2. Preparo das amostras	52
4.2.4.13.3. Corrida eletroforética	53
4.2.4.13.4. Transferência para a membrana	53
4.2.4.13.5. Bloqueio e hidridação com anticorpo monoclonal anti-BChE	54
4.2.4.13.6. Revelação da membrana e hibridação com o anticorpo anti-IgG conjugado à peroxidase	54
4.2.4.14. Estrutura terciária da butirilcolinesterase	55
4.2.5. Análise estatística	55

5. RESULTADOS 56

5.1. Seleção das amostras	56
5.1.1. Fenotipagem do loco <i>CHE2</i>	56
5.1.2. Atividade da BChE (KU/L)	56
5.1.3. Amplificação das amostras	59

5.2. Variabilidade genética	63
5.2.1. Exon 2	63

5.2.1.1. Nucleotídeos –42 a 204	63
5.2.1.2. Nucleotídeos 155 a 347	63
5.2.1.3. Nucleotídeos 304 a 535	68
5.2.1.4. Nucleotídeos 481 a 719	68
5.2.1.5. Nucleotídeos 659 a 876	72
5.2.1.6. Nucleotídeos 835 a 1059	72
5.2.1.7. Nucleotídeos 1000 a 1235	77
5.2.1.8. Nucleotídeos 1194 a 29 (intron 2)	77
5.2.1.9. Variabilidade e atividade da BChE.....	77
5.4.2. Exon 4.....	82
5.4.3. Heterozigosidade	86
5.4.4. Desequilíbrio de ligação	86
5.5. Expressão gênica.....	89
5.5.1. Sequenciamento do gene <i>BCHE</i> contendo as mutações novas.....	89
5.5.2. Atividade frente ao substrato butiriltiocolina	89
5.5.3. K_m verificado com o substrato butiriltiocolina	97
5.5.4. Valores de k_{cat}	97
5.5.4. <i>Western blot</i> para a enzima E90D	107
5.5.5. Estrutura terciária da BChE	107
6. DISCUSSÃO	112
6.1. Metodologia de seleção das amostras para detecção de variabilidade.....	112
6.2. Variabilidade genética.....	116
6.2.1. Dados gerais	116
6.2.2. Variações do gene <i>BCHE</i>	118
6.2.2.1. Nucleotídeos –42 a 204	119
6.2.2.2. Nucleotídeos 155 a 347	120
6.2.2.3 Nucleotídeos 304 a 535	121
6.2.2.4. Nucleotídeos 481 a 719	123
6.2.2.5. Nucleotídeos 659 a 876	124
6.2.2.6. Nucleotídeos 835 a 1059	126
6.2.2.7. Nucleotídeos 1000 a 1235	126
6.2.2.8. Nucleotídeos 1194 a 29 (intron 2)	127
6.2.2.9. Exon 4.....	127
6.3. Desequilíbrio de ligação e heterozigosidade.....	128
6.4. Expressão gênica das variantes não descritas anteriormente.....	129
6.4.1. Variantes com atividade e k_{cat} normais.....	130
6.4.1.1. Variante <i>K12R</i>	130
6.4.1.2. Variante <i>I99M</i>	131
6.4.1.3. Variante <i>V294M</i>	131
6.4.1.4. Variante <i>R470W</i>	131
6.4.2. Variantes com k_{cat} diminuído.....	132
6.4.2.1. Variante <i>G75R</i>	132
6.4.2.2. Variante <i>G333C</i>	132
6.4.3. Variante silenciosa.....	133
6.4.4. Aminoácidos determinados pelas mutações novas.....	135
7. CONCLUSÕES.....	137
7.1. Variabilidade genética.....	137
7.2. Expressão gênica.....	137

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
9. APÊNDICES	150
Apêndice 1. Amostras selecionadas para o presente estudo de acordo, com IMC, idade, grupo étnico e sexo.	151
Apêndice 2. Amostras fenotipadas como variantes não usuais ou como usuais para os exons 2 e 4.	165
10. ANEXOS	174
Anexo 1. Protocolo desenvolvido por Stacy Wieseler da Universidade do Nebraska (conservado na versão original) para usar o programa Excel (Microsoft) para o cálculo dos parâmetros bioquímicos.	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variantes do gene <i>BCHE</i>	16
Tabela 2. Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA utilizados na técnica de SSCA.....	28
Tabela 3. Condições das eletroforeses de SSCA para os diferentes fragmentos do gene <i>BCHE</i>	30
Tabela 4. Iniciadores utilizados nas reações de seqüenciamento com suas respectivas seqüências de nucleotídeos.....	33
Tabela 5. Iniciadores utilizados nas PCRs para introdução das mutações no gene <i>BCHE</i>	36
Tabela 6. Concentrações do substrato de butirilticolina ([S]) e volumes dos reagentes, utilizados no ensaio para cálculo dos parâmetros bioquímicos.....	48
Tabela 7. Protocolo de titulação das enzimas usual e variantes não usuais, com os reagentes utilizados e respectivos volumes.....	50
Tabela 8. Frequências dos fenótipos do loco <i>CHE2</i>	57
Tabela 9. Coeficientes de correlação (r) entre a atividade da BChE e as variáveis tempo de estocagem, idade e IMC em 570 indivíduos de fenótipo CHE2 C5–.....	57
Tabela 10. Média de atividade da BChE nos três grupos de atividade enzimática.....	60
Tabela 11. Tempo médio de estocagem, em meses, nos três grupos de atividade enzimática.....	60
Tabela 12. Resultados da análise de regressão múltipla escalonada, referentes à amostra de indivíduos de fenótipo CHE2 C5–, pertencentes aos três grupos de atividade da BChE (N = 390 ¹), considerando-se a atividade como variável dependente (Y).....	61
Tabela 13. Porcentagem de amplificação de cada fragmento analisado no exon 2.....	62

Tabela 14. Frequências de variações encontradas no segmento entre os nucleotídeos -42 e 204, de acordo com o grupo de atividade enzimática.....	64
Tabela 15. Frequências da mutação <i>D70G</i> nos indivíduos, de acordo com o grupo de atividade enzimática.....	66
Tabela 16. Frequências de variações encontradas no segmento entre os nucleotídeos 481 e 719, de acordo com o grupo de atividade enzimática.....	71
Tabela 17. Frequências de variações, encontradas no segmento entre os nucleotídeos 659 e 876, de acordo com o grupo de atividade enzimática.....	73
Tabela 18. Frequências de variações encontradas no segmento entre os nucleotídeos 835 e 1059, de acordo com o grupo de atividade enzimática.....	75
Tabela 19. Médias de atividade em KU/L das variantes não usuais e usuais do exon 2, classificadas por grupo de atividade enzimática.....	80
Tabela 20. Frequências de variantes encontradas e porcentagem de amplificação em cada segmento analisado, de acordo com os três grupos de atividade enzimática.....	81
Tabela 21. Frequências dos genótipos e do alelo <i>A539T</i> (mutação K) nos três grupos de atividade enzimática.....	83
Tabela 22. Médias de atividade dos três genótipos quanto à variação <i>A539T</i> (mutação K) do exon 4, separadas por grupo de atividade enzimática.....	85
Tabela 23. Número de indivíduos com variantes no exon 2 e/ou exon 4 do gene <i>BCHE</i>	87
Tabela 24. Genótipos considerando-se as variantes <i>D70G</i> (nt 209) e <i>A539T</i> (nt 1615).....	88
Tabela 25. Genótipos considerando-se as variantes <i>E255D</i> (nt 765) e <i>A539T</i> (nt 1615).....	88

Tabela 26. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) e de atividade em U/mL para as variantes expressas, enzima usual expressa (controle positivo) e células sem plasmídeo (controle negativo).....	98
Tabela 27. Valores de K_m , V_{max} , K_{ss} e b , obtidos em programa Excel, a partir de dados de experimentos com diferentes concentrações de butirilticolina (BTC).....	98
Tabela 28. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima usual, com respectivas concentrações de inibidor (CPO).....	99
Tabela 29. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima K12R, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).....	100
Tabela 30. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima G75R, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).....	101
Tabela 31. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima I99M, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).....	102
Tabela 32. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima V294M, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).....	103
Tabela 33. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima G333C, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).....	104
Tabela 34. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima R470W, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).....	105
Tabela 35. Valores das concentrações das enzimas variantes expressos em moles/L.....	106
Tabela 36. Valores de K_{cat} expressos em min^{-1} para as variantes novas e para a enzima usual.....	106
Tabela 37. Número de variantes diferentes do gene <i>BCHE</i> já descritas anteriormente e encontradas no presente trabalho, dentro de cada fragmento analisado.....	117
Tabela 38. Distâncias físico-químicas dos aminoácidos alterados nas mutações descritas no presente trabalho.....	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação da sequência de aminoácidos da BChE e da AChE em diferentes organismos.....	7
Figura 2 - Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i> , mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem.....	8
Figura 3. Sequência de nucleotídeos do gene da BChE.....	9
Figura 4. Gene <i>BCHE</i> em vetor pGS.....	37
Figura 5. Gel de agarose (1% em tampão TAE 1X) de baixo ponto de fusão (LMP).....	39
Figura 6. Distribuição da atividade da BChE em 570 doadores de sangue masculinos, euro-brasileiros e de fenótipo CHE2 C5–.....	58
Figura 7. Variantes <i>K12R</i> e <i>G15G</i> . A) Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt –42 a 204. 1- Heterozigoto <i>K12R/U</i> , 2- Heterozigoto <i>G15G/U</i> e 3- Controle usual homozigoto. B) Eletroferogramas das variantes: 1) Heterozigoto <i>K12R/U</i> . 2) Heterozigoto <i>G15G/U</i>	65
Figura 8. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 155 a 347.....	67
Figura 9. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 304 a 535.....	69
Figura 10. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 481 a 719.....	70
Figura 11. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 659 a 876.....	74

Figura 12. Variantes <i>V294M</i> e <i>G333C</i> . A) Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 835 e 1059. 1- Controle usual homozigoto e 2- Heterozigotos <i>V294M</i> e <i>G333C</i> (ambas apresentam o mesmo padrão de bandas). B) Eletroferogramas das variantes: 1) Heterozigoto <i>V294M/U</i> (fita antisense) 2) Heterozigoto <i>G333C/U</i>	76
Figura 13. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 1000 a 1235.....	78
Figura 14. Variante <i>R470W</i> A) Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 1194 a 29 (intron 2). 1- Controle usual homozigoto e 2- Heterozigoto <i>R470W/U</i> . B) Eletroferograma do heterozigoto <i>R470W/U</i>	79
Figura 15. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt -31 (intron 3) a 1758 do exon 4.	84
Figura 16. Variante <i>K12R</i> em vetor pGS.....	90
Figura 17. Variante <i>G75R</i> em vetor pGS.....	91
Figura 18. Variante <i>E90D</i> em vetor pGS.....	92
Figura 19. Variante <i>I99M</i> em vetor pGS.....	93
Figura 20. Variante <i>V294M</i> em vetor pGS.....	94
Figura 21. Variante <i>G333C</i> em vetor pGS.....	95
Figura 22. Variante <i>R470W</i> em vetor pGS.....	96
Figura 23. Gráfico obtido a partir da Tabela 28 para a determinação do ponto de inibição total da enzima usual pelo CPO.....	99
Figura 24. Gráfico obtido a partir da Tabela 29 para a determinação do ponto de inibição total da enzima <i>K12R</i> pelo CPO.....	100
Figura 25. Gráfico obtido a partir da Tabela 30 para a determinação do ponto de inibição total da enzima <i>G75R</i> pelo CPO.....	101

Figura 26. Gráfico obtido a partir da Tabela 31 para a determinação do ponto de inibição total da enzima I99M pelo CPO.....	102
Figura 27. Gráfico obtido a partir da Tabela 32 para a determinação do ponto de inibição total da enzima V294M pelo CPO.....	103
Figura 28. Gráfico obtido a partir da Tabela 33 para a determinação do ponto de inibição total da enzima G333C pelo CPO.....	104
Figura 29. Gráfico obtido a partir da Tabela 34 para a determinação do ponto de inibição total da enzima R470W pelo CPO.....	105
Figura 30. Western blot da variante E90D. A) Meio de cultura das células 293T com o vetor contendo a mutação <i>E90D</i> . B) BChE purificada de a partir de plasma.....	108
Figura 31. Western blot da variante E90D em células CHO.....	109
Figura 32. Vistas parciais da estrutura terciária da enzima butirilcolinesterase.....	110
Figura 33. Modelo da estrutura terciária da enzima butirilcolinesterase humana com a mutação <i>K12R</i>	111

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT	5 hidroxitriptamina
AAA	Aril acilamidase amino sensitiva
AChE	Acetilcolinesterase
Asp	Aspartato
AT	Atividade total
BChE	Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	Gene da butirilcolinesterase
BMI	Body mass index (índice de massa corporal)
BTC	Butiriltiocolina
cDNA	DNA complementar
<i>CHE2</i>	Gene condicionador do complexo C ₅ da butirilcolinesterase
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPO	Clorpirifos-oxon
Cys	Cisteína
DFP	Diisopropilfluorfosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzóico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenoaminotetraacético
EP	Erro padrão
GL	Grau de liberdade
Glu	Glutamato
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
His	Histidina
IMC	Índice de massa corporal
Leu	Leucina
LMP	baixo ponto de fusão

MSX	Metionina sulfoximina
ND	Número de dibucaína
Nt	Nucleotídeo
PBS	Phosphate buffered saline (Salina fosfato tamponada)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso molecular
RFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Ro2-0683	Dimetilcarbamato do brometo de 2-hidroxi-5-fenil-benziltrimetilamônio
RON	Número de Ro2-0683
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SSCA	Análise conformacional de fita simples
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
TBS	Tris buffered saline (Salina fosfato tamponada)
TE	Tampão tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Trp	Triptofano
Val	Valina
WT	Tipo selvagem

RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima sérica produzida no fígado e adipócitos, sendo amplamente distribuída no organismo. É codificada pelo gene *BCHE*, onde mais de 50 alelos foram identificados, além do alelo mais freqüente: usual ou selvagem. Nesse estudo foram detectadas variantes do gene *BCHE* e determinadas suas freqüências, em amostras de doadores de sangue da população de Curitiba. A fim de priorizar o efeito das variantes desse gene sobre a atividade da BChE, algumas variáveis, que também exercem efeito sobre a atividade, foram tornadas constantes ou tiveram sua variância minimizada. Assim, consideraram-se apenas homens euro-brasileiros, de fenótipo CHE2 C5-, com faixa etária entre 18 e 30 anos e $20 \leq \text{IMC} \leq 25$. Dos 570 indivíduos analisados quanto à atividade enzimática, foram separados 370, pertencentes a três grupos de atividade (baixa, média e alta), para serem examinados quanto à variação do DNA. As seqüências codificadoras dos exons 2 e 4 foram amplificadas e analisadas pela técnica de SSCA. Foram encontrados 12 tipos diferentes de variantes (11 no exon 2 e 1 no exon 4) em 127 das 370 amostras, sendo que 20 das 127 amostras apresentaram *A539T* do exon 4 (segunda variante mais freqüente) e uma outra mutação no exon 2. A variante *A539T* foi encontrada com uma freqüência total de $17,49\% \pm 1,40\%$, sendo mais freqüente no grupo de atividade baixa ($32,63\% \pm 3,05\%$). A maioria das mutações no exon 2 também está concentrada no grupo de atividade baixa. A terceira mutação mais freqüente foi a *D70G* ($1,80\% \pm 0,49\%$), seguida de *E255D* ($0,98\% \pm 0,37\%$), *A184V* ($0,70\% \pm 0,31\%$), *T243M* ($0,28\% \pm 0,19\%$) e *G390V* ($0,28\% \pm 0,19\%$). As outras variantes não sinônimas apareceram apenas em um heterozigoto cada (*K12R*, *V294M*, *G333C* e *R470W*), com freqüência alélica de $0,14\% \pm 0,14\%$. Além dessas variantes, foram encontradas duas mutações sinônimas, uma no grupo de atividade baixa (*A162A*; $0,14\% \pm 0,14\%$) e outra no de atividade média (*G15G*; $0,14\% \pm 0,14\%$). Cinco dessas mutações, *K12R*, *G15G*, *V294M*, *G333C* e *R470W*, ainda não tinham sido descritas. Plasmídeos contendo insertos com as quatro novas mutações não sinônimas, e três mutações (*G75R*, *E90D* e *I99M*) descritas por SOUZA et al. (no prelo) foram expressos em células 293T para determinar a atividade da BChE. Apenas a variante *E90D* condiciona fenótipo silencioso; as mutações *G75R* e *G333C* condicionam BChE com atividade de, respectivamente, 45% e 20% da atividade da enzima usual; as outras 4 mutações determinam BChE de atividade normal. O fato de muitas mutações causarem efeitos na estrutura e na expressão da BChE, podendo ser responsáveis pela diminuição na atividade enzimática, explica a maior proporção dos genótipos não usuais no grupo de atividade baixa, representando 79% dos encontrados no exon 2 e 56% dos encontrados no exon 4.

ABSTRACT

Butyrylcholinesterase (BChE) is a serum enzyme synthesized in the liver and adipose cells and it is widely distributed in the body. It is coded by the *BCHE* gene where more than 50 alleles had been identified, besides the most frequent allele: the usual or wild type. In this study *BCHE* gene variants were detected and their frequencies were determined in samples from blood donors of the Curitiba population. In order to give priority to the effect of gene variants on BChE activity, some variables which also affect this activity were set as constants or had their variance minimized. Thus, the subjects were only Euro-Brazilian males of the CHE2 C5– phenotype, aged from 18 to 30 years and with $20 \leq \text{BMI} \leq 25$. Plasmas from the 570 subjects were tested for BChE activity and 370 of them classified into 3 activity groups (low, mean and high) were examined for DNA variation. Exons 2 and 4 of the coding sequence of the *BCHE* gene were amplified and analyzed by SSCA. Twelve different types of variants were found (11 in exon 2 and 1 in exon 4) in 127 out of 370 samples of which 20 samples presented the *A539T* variant in exon 4 (second more frequent variant) and another variant in exon 2 simultaneously. The *A539T* variant was found with a total frequency of $17.49\% \pm 1.40\%$, being more frequent in the low BChE activity group ($32.63\% \pm 3.05\%$). Mostly of exon 2 mutations were found in the low activity group. The third more frequent variant was *D70G* ($1.80\% \pm 0.49\%$), followed by *E255D* ($0.98\% \pm 0.37\%$), *A184V* ($0.70\% \pm 0.31\%$), *T243M* ($0.28\% \pm 0.19\%$) and *G390V* ($0.28\% \pm 0.19\%$). The other non synonymous variants were found only once in one heterozygote (*K12R*, *G15G*, *V294M*, *G333C* and *R470W*), with an allelic frequency of $0.14\% \pm 0.14\%$. Besides these, two synonymous mutations were found, one in the low activity group (*A162A*; $0.14\% \pm 0.14\%$) and another in the mean activity group (*G15G*; $0.14\% \pm 0.14\%$). Five of these mutations, *K12R*, *G15G*, *V294M*, *G333C* and *R470W* had not been previously reported. Plasmids containing the inserts with these 4 new non synonymous mutations and 3 mutations (*G75R*, *E90D* and *I99M*) described by SOUZA et al. (in press) were expressed in 293T cells in order to determine BChE activity. Only the *E90D* variant determines a silent phenotype; the *G75R* and *G333C* mutations are responsible for enzymes with BChE activity of about 45% and 20% of the wild type enzyme, respectively; the other 4 mutations determine BChE with normal activity. The fact that many mutations cause effects in BChE structure and expression, and may lead to decreased enzyme activity, explains the higher non usual genotype proportion in the low activity group, representing 79% of these genotypes found in exon 2 and 56% of these genotypes found in exon 4.

1. INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), também chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica e colinesterase do tipo S é uma enzima sérica, produzida no fígado e tecido adiposo e amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada na pele, pâncreas, substância branca do cérebro, coração, músculo liso e adipócitos (WESCOE et al., 1947). Embora se conheça o papel da BChE na hidrólise de diversos ésteres de colina, como a butirilcolina, a função fisiológica e o substrato natural da BChE permanecem desconhecidos. Várias evidências a relacionam à condução nervosa lenta, à regulação de níveis de colina e acetilcolina no plasma, à proteção da acetilcolinesterase e ao controle da permeabilidade e transporte de sódio e outros íons pela membrana (WHITTAKER, 1986). CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) e ALCÂNTARA (2000) encontraram correlação entre a atividade de formas heterólogas da BChE com peso e índice de massa corporal, sugerindo uma provável função dessa enzima no metabolismo de lipídios. Outros estudos mostraram correlação da atividade da BChE com obesidade (KUTTY, 1980), com desenvolvimento embrionário, proliferação e diferenciação celulares (LAYER e SPORNS, 1987; BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

A butirilcolinesterase apresenta-se no sangue humano em várias formas moleculares. Pode estar apenas como BChE (monômero, dímero, trímero e tetrâmero) ou compor formas heterólogas, nas quais está associada com outras substâncias como a albumina, a α 2-macroglobulina e outras ainda não identificadas. Em eletroforese de gel de poliacrilamida podem ser vistas até 12 bandas com atividade de BChE (JUUL, 1968; ALCÂNTARA, 2000), sugerindo a existência de pelo menos oito formas heterólogas.

A variabilidade genética dessa enzima começou a ser revelada desde a década de 50, quando se verificou que os indivíduos diferiam na sua capacidade de hidrolisar a succinilcolina, relaxante muscular hidrolisável pela BChE. A primeira variante descrita (atípica, *D70G*) foi descoberta por não ser capaz de hidrolisar esse relaxante,

em doses farmacológicas, causando apnéia respiratória e paralisia muscular prolongadas nos pacientes.

A BChE é codificada pelo gene *BCHE*, localizado no braço longo do cromossomo 3 (GAUGHAN et al., 1991; ALLDERDICE et al., 1991). Tanto a estrutura do gene como a da proteína da BChE são bastante similares às da acetilcolinesterase (AChE), o que leva a se admitir a hipótese de que seus respectivos genes tenham sido derivados de um gene ancestral comum. Os diversos alelos do loco *BCHE* são atualmente identificados ao nível de DNA. Alguns alelos determinam enzimas com diferentes comportamentos frente a diversos inibidores e substratos e podem ser detectados por testes de inibição enzimática.

A enzima pode apresentar variação genética devida à variabilidade do loco *CHE2*, que condiciona uma proteína, ainda desconhecida, responsável pela formação do complexo C₅ (HARRIS et al., 1962), cuja presença ou ausência é detectada em eletroforese. O loco *CHE2* apresenta os alelos *CHE2**C₅⁺ e *CHE2**C₅⁻ responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência desse complexo, sendo que o alelo *CHE2**C₅⁺ determina aumento de cerca de 25% na atividade da BChE.

Nesse estudo foi analisada a variabilidade do gene *BCHE* em três diferentes grupos de atividade da BChE (baixa, média e alta), em amostras de plasma de doadores de sangue da população de Curitiba, visando a descrição de possíveis mutações e sua posterior identificação por seqüenciamento de DNA. Em vista da influência das variáveis sexo, idade, grupo étnico, índice de massa corporal (IMC) e fenótipos do loco *CHE2* sobre a atividade da enzima butirilcolinesterase, só foram examinados homens, de idade entre 18 e 30 anos, euro-brasileiros com $20 \leq \text{IMC} \leq 25$ e de fenótipo *CHE2* C₅⁻. O estudo do gene *BCHE* ao nível do DNA teve como objetivo completar os dados obtidos por SOUZA (2001), visto que esse autor não analisou determinados segmentos desse gene e, além disso, tentar descobrir alelos condicionadores de fenótipos silenciosos (atividade menor que 10% da usual) e enzimas de alta atividade, seja pela síntese aumentada ou pelo aumento da atividade catalítica.

Como a maioria dos estudos populacionais sobre as frequências das mutações do loco *BCHE* baseia-se em dados de inibição enzimática, a análise de vários segmentos de DNA desse gene, pela técnica de PCR-SSCA, permitiu a detecção de mutações novas através de alterações conformacionais no DNA de fita simples.

As variações não usuais detectadas foram seqüenciadas e aquelas confirmadas como mutações novas não sinônimas foram expressas em células CHO e 293T. A estratégia utilizada foi a introdução dessas mutações no gene *BCHE* clonado no vetor pGS, por meio de mutagênese sítio-dirigida. Essas variantes expressas tiveram seus parâmetros bioquímicos avaliados para a determinação do fenótipo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais

Em vertebrados, duas enzimas diferentes hidrolisam a acetilcolina. A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7; AChE) termina a ação da acetilcolina na membrana pós sináptica na junção neuromuscular. A outra enzima hidrolisa acetilcolina e outros ésteres, mas não tem função fisiológica conhecida. Ela é chamada butirilcolinesterase, pseudocolinesterase, colinesterase não específica e colinesterase do soro (EC 3.1.1.8; BChE). Em vertebrados, ambas as enzimas são inibidas por fisostigmina na concentração de 10^{-5} M (AUGUSTINSSON, 1963). ALLES e HAWES (1940) demonstraram que a BChE difere da AChE, pois essa última, que hidrolisa normalmente a acetilcolina, é inibida por altas concentrações desse substrato, enquanto a BChE tem sua atividade aumentada nessas condições. As colinesterases também podem ser diferenciadas através das respostas frente a diferentes inibidores. Em doses terapêuticas de bambuterol (bismetilcarbamato de terbutalina) somente a BChE é inibida.

Embora as duas enzimas apresentem séries paralelas de formas moleculares incluindo monômeros, dímeros, tetrâmeros e oligômeros complexos, elas diferem em especificidade e sensibilidade inibitória. Tanto a AChE como a BChE secretadas nos fluidos corpóreos existem como formas solúveis em água. O tetrâmero da BChE representa a forma predominante encontrada no plasma. Este tetrâmero é uma associação de dois dímeros por interações hidrofóbicas fortes. As duas subunidades de cada dímero são ligadas por uma ligação dissulfeto na Cys 571. Dímeros e monômeros encontrados no plasma parecem ser produtos de dissociação de tetrâmeros (LOCKRIDGE et al., 1987b).

A butirilcolinesterase do soro tem um papel chave na hidrólise do relaxante muscular succinilcolina que é administrado durante a anestesia (KALOW e GUNN, 1959). Pacientes com variantes genéticas anormais da BChE podem sofrer de apnéia prolongada quando submetidos a doses padrões dessa droga.

A BChE hidrolisa ésteres de colina, bem como ésteres alifáticos que não contém colina, tais como o ácido acetilsalicílico (HARRIS, 1980). É sintetizada no

fígado (WESCOE et al., 1947), sendo também encontrada em outras partes do corpo, entre as quais plasma, músculo liso, adipócitos, pâncreas, pele, massa branca do cérebro e coração. Sua posição, em eletroforese de proteínas (pH 8,6), está entre as α e β -globulinas.

2.2. Origem das colinesterases

As enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase são enzimas distintas codificadas por dois genes diferentes, mas relacionados.

A sequência de aminoácidos da BChE humana tem 54% de identidade com a AChE de *Torpedo californica* e *Torpedo marmorata* e 38% de identidade com a AChE de *Drosophila melanogaster* (McTIERNAN et al., 1987). A BChE e a AChE têm aproximadamente o mesmo número de aminoácidos por subunidade catalítica, 574 e 575, respectivamente, e suas diferenças no peso molecular são devidas a diferenças na glicosilação. A AChE tem 4 e a BChE tem 9 cadeias de carboidratos por subunidade (SCHUMACHER et al., 1986; LOCKRIDGE et al., 1987a; LOCKRIDGE et al., 1987b). As ligações de dissulfeto de ambas as enzimas estão localizadas exatamente na mesma posição, sugerindo dobramento protéico similar (MACPHEE-QUIGLEY et al., 1986; LOCKRIDGE et al., 1987b). O gene da AChE de *Torpedo* tem um grande exon que contém a maior parte da sequência codificadora, assim como ocorre no exon 2 do gene da BChE humana. A grande similaridade entre os genes da BChE humana e AChE de *Torpedo* sugerem que esses genes derivam de um gene ancestral comum. No nematodo *Caenorhabditis elegans* existem 3 genes de AChE, sendo o *ace-1* o mais semelhante ao gene da AChE de vertebrados. O gene *ace-1* de *C. elegans*, assim como o gene *ACHE* de *Drosophila* contém 7 exons na região onde é encontrado um único exon nos genes da AChE e BChE dos vertebrados, indicando uma divergência evolutiva entre essas enzimas após a separação dos grupos que deram origem aos insetos e vertebrados (ARGAPPAUS et al., 1990; 1994).

As sequências de aminoácidos dos sítios ativos da BChE e da AChE estão conservadas em muitas espécies estudadas e os resíduos de serina, histidina e

glutamato são considerados importantes para a atividade catalítica de ambas (Figura 1). Essa identidade das duas colinesterases também é percebida por outras propriedades.

ROBSON et al. (1966) verificaram que o gene *BCHE* apresenta ligação com o gene da transferrina. Posteriormente, o gene da transferrina foi atribuído ao cromossomo 3 (YANG et al., 1984) e ao seu braço longo (SPARKES et al., 1984; ZAKUT et al., 1989). ARPAGAUSS et al. (1990) determinaram a sequência de nucleotídeos e a estrutura do gene *BCHE*. Esse gene tem cerca de 73 kb, possui quatro exons, formados por 2.416 pares de bases, e três introns (OMIM; ENTREZ, 2005 - +177400; Figuras 2 e 3).

A BChE pode apresentar variação detectada por eletroforese e devida à variabilidade do loco *CHE2*, que condiciona uma substância, ainda desconhecida, que se liga ao tetrâmero da BChE (MASSON, 1991; OMIM; ENTREZ, 2005 - 177500). Esse loco está em ligação com o conjunto gênico CRYG (γ -Cristallin cluster) localizado no braço longo do cromossomo 2 (EIBERG et al., 1989). Esse polimorfismo se caracteriza pela presença ou ausência de uma banda detectada em eletroforese, denominada C₅, cujo padrão de herança é autossômico dominante (HARRIS et al., 1962). Em populações caucasóides, a frequência desse alelo é de cerca de 5%.

2.3. Estrutura da BChE

A BChE humana circula no soro principalmente como uma glicoproteína tetramérica.

Cada monômero consiste de 574 aminoácidos e tem nove cadeias de carboidratos, ancoradas a 9 asparaginas (LOCKRIDGE et al., 1987a). Os dímeros são formados pela união de monômeros por uma ligação dissulfeto intercadeias (Cys⁵⁷¹ – Cys⁵⁷¹; LOCKRIDGE et al., 1987b). O tetrâmero é formado por dímeros e, com suas cadeias de carboidratos, possui aproximadamente 340 kDa.

ACHeHomo	AFGGDPTSVTLFGESAGAAASVGMHLLSPPSRGLFHRAVLQSGAPNGPWAIVTVMGEARRRA
ACHeMosca	AFGGNPFWMTLFGESAGSSSVNAQIMSPTVRGLVKGMMQSGTMNAPWSHMTSEKAVEIG
ACHeMus	AFGGDPTSVTLFGESAGAAASVGMHLLSLPSRSLFHRAVLQSGTPNGPWAIVTSAGEARRRA
BChECavalo	AFGGNPRSVTLFGESAGAAASVSLHLLSPRSQPLFTRAILQSGSSNAPWAVTSLYEARNRT
BChEGalo	SFGGNPKSVTLFGESAGASVSYSYHILSPKSHPLFTRAIMQSGSANAPWAAITASEARRRT
BChEGato	AFGGNPKSVTLFGESAGASVSLHLLSPRSQPLFTRAILQSGSSNAPWAVMSLDEAKNRT
BChEHomo	AFGGNPKSVTLFGESAGAAASVSLHLLSPGSHSLFTRAILQSGSFNAPWAVTSLYEARNRT
BChEMus	AFGGNPKSVTLFGESAGAAASVSLHLLCPQSYPLFTRAILQSGSSNAPWAVKHPEEARNRT
BChETigre	AFGGNPKSVTLFGESAGASVSLHLLSPRSQPLFTRAILQSGSSNAPWAVMSLDEAKNRT
BChERato	AFGGNPKSVTLFGESAGAAASVSLHLLCPQSYPLFTRAILQSGSSNAPWAVKHPEEARNRT
ACHeHomo	TQLAHLVGCPPGGTGGNDTELVACLRTRPAQVLVNHEWHVLPQESVFRFSFVPPVVDGDFL
ACHeMosca	KALVNDNCNANASLLPENPQAVMACMRQVDAKTISVQQWNSYSG--ILSFPSAPTIDGAFL
ACHeMus	TLLARLVGCPPGGAGGNDTELIACLRTRPAQDLVDHEWHVLPQESIFRFSFVPPVVDGDFL
BChECavalo	LTLAKRMGCSR-----NETEMIKCLRKDPQEILLNEVFVVPYDTLLSVNFGPTVDGDFL
BChEGalo	VALAKQLKCPST-----DETELILCLQDKDKDILENEVYVVKYFSLLIHYECPTVDGDFL
BChEGato	LTLAKFTGCSKE-----NDTEIILKLRNKDPQEILLNELLVVPSDTLLSVNFGPPVVDGDFL
BChEHomo	LNLAKLTGCSRE-----NETEIIKCLRNKDPQEILLNEAFVVPYGTPLSVNFGPTVDGDFL
BChEMus	LTLAKFTGCSKE-----NEMEMIKCLRSKDPQEILRNERFVLPDSILSINFGPTVDGDFL
BChETigre	LTLAKFTGCSKE-----NDTEIILKLRNKDPQEILLNELLVVPSDTLLSVNFGPPVVDGDFL
BChERato	LTLAKFTGCSKE-----NEKEIITCLRSKDPQEILLNEKLVLPDSIRSINFGPTVDGDFL
ACHeHomo	SDTPEALINAGDFHGLQVLVGVVKDEGSYFLVYGAPG-FSKDNESLISRAEFLAGVRVGV
ACHeMosca	PADPMTLTKTADLSGYDILIGNVKDEGTYFLYDFIDYFDKDDATSLPRDKYLEIMNNIF
ACHeMus	SDTPEALINTGDFQDLQVLVGVVKDEGSYFLVYGVPG-FSKDNESLISRAEFLAGVRIGV
BChECavalo	TDMPDTLLQLGQFKRTQILVGVNKDEGTAFLVYGAPG-FSKDNNSIITRKEFQEGCLKIFF
BChEGalo	ADMPEALIKNGIFKQTQVLVGVNKDEGTSFLVYGVPG-FSKDSDSLINKTOFEVALTSLF
BChEGato	TDMPDTLLQLGQFKKTQILVGVNKDEGTAFLVYGAPG-FSKDNDSIITRKEFQEGCLKIYF
BChEHomo	TDMPDILLELGQFKKTQILVGVNKDEGTAFLVYGAPG-FSKDNNSIITRKEFQEGCLKIFF
BChEMus	TDMPHTLLQLGKVKKAQILVGVNKDEGTAFLVYGAPG-FSKDNDSLITRKEFQEGLNMYF
BChETigre	TDMPDTLLQLGQFKKTQILVGVNKDEGTAFLVYGAPG-FSKDNDSIITRKEFQEGCLKIYF
BChERato	TDMPHTLLQLGKVKTAQILVGVNKDEGTAFLVYGAPG-FSKDNDSLITRKEFQEGLNMYF
ACHeHomo	PQVSDLAEEAVVLHYTDWLHPEDPARLREALSDVVGDHNVVCPVAQLAGRLAAQGARVYA
ACHeMosca	QKASQAEFEAIIIFQYTSWEGNPGYQ-NQQQIGRAVGDFHFTCTNEYAQALAEFGASVHY
ACHeMus	PQASDLAAEAVVLHYTDWLHPEDPHTLRDAMSAVVGDNHNVVCPVAQLAGRLAAQGARVYA
BChECavalo	PRVSEFGRESILFHMDWLDQRAENYREALDDVVGDDYNIICPALEFTKKFSELGNDAFF
BChEGalo	PQVSKLATESIIFQYTDWENEQKPEHYRDAMDDVIGDYHIICPAVEFAKTIAEVGNNVFF
BChEGato	PGVSEFGREAILFYVVDLDDQRAEKYREALDDVLGDYNIICPALEFTTKFSELGNNAFF
BChEHomo	PGVSEFGKESILFHYTEWDDQRPENYREALGDVVGDDYNIICPALEFTKKFSEWGNNAFF
BChEMus	PGVSRGKEAVLFYVVDLGEQSPVYRDALDDVIGDYNIICPALEFTKKFAELNNAFF
BChETigre	PGVSEFGREAILFYVVDLDDQRAEKYREALDDVLGDYNIICPALEFTTKFSELGNNAFF
BChERato	PGVSSLGKEAILFYVVDWLGDQTPVYREAFDDIIGDYNIICPALEFTKKFAELEINNAFF
ACHeHomo	YVFEHRASTLSWPLWMGVPHGYEIEFI FGLPLDPSRNYTAEKIFAQRLMRYWANFARTG
ACHeMosca	YYFTHRTSTSLWGEWMLGVHGDIEIEYFQGPLNNSLQYRPVERELGKRMNSVIEFAKSG
ACHeMus	YVFEHRASTLSWPLWMGVPHGYEIEFI FGLPLDPSLNYTTEBRIFAQRLMKYWNFARTG
BChECavalo	YYFEHRS TKLPWPEWMGVPHGYEIEFVFGPLPERRVNYTKAEEILSRSIMKRWANFAKYG
BChEGalo	YFFEHRSSKLPWPEWMGVPHGYEIEFVFGPLPERRVNYTKAEEILSRSMRYWASFAKTG
BChEGato	YYFEHRSSQLPWPEWMGVPHGYEIEFVFGPLPERRVNYTRAEEILSRSIMNYWANFAKYG
BChEHomo	YYFEHRSSKLPWPEWMGVPHGYEIEFVFGPLPERRDNYTKAEEILSRSIKRWANFAKYG
BChEMus	YFFEHRSSKLPWPEWMGVPHGYEIEFVFGPLPERRVNYTRAEEIFSRSIMKTWANFAKYG
BChETigre	YYFEHRSSQLPWPEWMGVPHGYEIEFVFGPLPERRVNYTRAEEILSRSIMNYWANFAKYG
BChERato	YYFEHRSSKLPWPEWMGVPHGYEIEFVFGPLPERRVNYTRAEEIFSRSIMKTWANFAKYG

Figura 1. Sequências parciais de aminoácidos da BChE e da AChE em diferentes organismos. Os fundos preto, cinza e branco destacam, respectivamente, os aminoácidos totalmente conservados, conservados na maioria dos organismos e não conservados. Destacam-se os aminoácidos da tríade catalítica do sítio ativo da BChE: Ser198 (vermelho), Glu325 (azul) e His438 (magenta).



Figura 2 - Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem. A região hachurada corresponde à proteína madura.

tttcaagttg ctgctgccaa ctctcgcgag ctttgtcagt aacagttgat
 -69
 limite do cDNA Met
 tgttacattc agtaac ↑ actga ATG TCA GTG CAG TCC AAT TTA CAG GCT
 -47
 Met
 GGA GCA GCA GCT GCA TCC TGC ATT TCC CCG AAG TAT TAC ATG ATT TTC
 EXON 1:
 ACT CCT TGC AAA CTT TGC CAT CTT TGT TGC AGA GAA TCG G
 INTRON 1
 gtaagttgct ctgaatttac accttcgtgt agagatccaa gttactgtaa
 agctcattct gtgggatgag agtgatctct tcatgtgttt gttgtgtccc
 tttggtgctc tgtggggaac agttactgaa gcttgcaaat gggacagagg aagtgagcc
 tttacagaat caggtttatt tgtttcataa tttgtagaat
 tatcaagcat catatttttag gtaattatca tcaataaagt ataatatgct
 INTRON 1:
 atatgcagaa ggcttataaa acattatact tacctctctt tcag
 -28
 EXON 2 Met
 AA ATC AAT ATG CAT AGC AAA GTC ACA ATC ATA TGC
 ATC AGA TTT CTC TTT TGG TTT CTT TTG CTC TGC ATG CTT ATT GGG AAG
 -1 +1
 TCA CAT ACT GAA GAT GAC ATC ATA ATT GCA ACA AAG AAT GGA AAA
 13 GTC AGA GGG ATG AAC TTG ACA GTT TTT GGT GGC ACG GTA ACA GCC TTT
 29 CTT GGA ATT CCC TAT GCA CAG CCA CCT CTT GGT AGA CTT CGA TTC AAA
 45 AAG CCA CAG TCT CTG ACC AAG TGG TCT GAT ATT TGG AAT GCC ACA AAA
 61 TAT GCA AAT TCT TGC TGT CAG AAC ATA GAT CAA AGT TTT CCA GGC TTC
 77 CAT GGA TCA GAG ATG TGG AAC CCA AAC ACT GAC CTC AGT GAA GAC TGT
 93 TTA TAT CTA AAT GTA TGG ATT CCA GCA CCT AAA CCA AAA AAT GCC ACT
 109 GTA TTG ATA TGG ATT TAT GGT GGT GGT TTT CAA ACT GGA ACA TCA TCT
 125 TTA CAT GTT TAT GAT GGC AAG TTT CTG GCT CGG GTT GAA AGA GTT ATT
 141 GTA GTG TCA ATG AAC TAT AGG GTG GGT GCC CTA GGA TTC TTA GCT TTG
 157 CCA GGA AAT CCT GAG GCT CCA GGG AAC ATG GGT TTA TTT GAT CAA CAG
 173 TTG GCT CTT CAG TGG GTT CAA AAA AAT ATA GCA GCC TTT GGT GGA AAT
 189 CCT AAA AGT GTA ACT CTC TTT GGA GAA AGT GCA GGA GCA GCT TCA GTT
 205 AGC CTG CAT TTG CTT TCT CCT GGA AGC CAT TCA TTG TTC ACC AGA GCC
 221 ATT CTG CAA AGT GGA TCC TTT AAT GCT CCT TGG GCG GTA ACA TCT CTT
 237 TAT GAA GCT AGG AAC AGA ACG TTG AAC TTA GCT AAA TTG ACT GGT TGC
 253 TCT AGA GAG AAT GAG ACT GAA ATA ATC AAG TGT CTT AGA AAT AAA GAT

continua

continuação

```

269 CCC CAA GAA ATT CTT CTG AAT GAA GCA TTT GTT GTC CCC TAT GGG ACT
285 CCT TTG TCA GTA AAC TTT GGT CCG ACC GTG GAT GGT GAT TTT CTC ACT
301 GAC ATG CCA GAC ATA TTA CTT GAA CTT GGA CAA TTT AAA AAA ACC CAG
317 ATT TTG GTG GGT GTT AAT AAA GAT GAA GGG ACA GCT TTT TTA GTC TAT
333 GGT GCT CCT GGC TTC AGC AAA GAT AAC AAT AGT ATC ATA ACT AGA AAA
349 GAA TTT CAG GAA GGT TTA AAA ATA TTT TTT CCA GGA GTG AGT GAG TTT
365 GGA AAG GAA TCC ATC CTT TTT CAT TAC ACA GAC TGG GTA GAT GAT CAG
381 AGA CCT GAA AAC TAC CGT GAG GCC TTG GGT GAT GTT GTT GGG GAT TAT
397 AAT TTC ATA TGC CCT GCC TTG GAG TTC ACC AAG AAG TTC TCA GAA TGG
413 GGA AAT AAT GCC TTT TTC TAC TAT TTT GAA CAC CGA TCC TCC AAA CTT
429 CCG TGG CCA GAA TGG ATG GGA GTG ATG CAT GGC TAT GAA ATT GAA TTT
445 GTC TTT GGT TTA CCT CTG GAA AGA AGA GAT AAT TAC ACA AAA GCC GAG
461 GAA ATT TTG AGT AGA TCC ATA GTG AAA CGT TGG GCA AAT TTT GCA AAA
    EXON 2:INTRON 2
477 TAT GG gtaagtgctg attttttgtc attgttctct ggcttggttt .....
                                INTRON 2:
tctaacaatg atttcaatgt tactataatg tctctatgtt attatttag
EXON 3
478 G AAT CCA AAT GAG ACT CAG AAC AAT AGC ACA AGC TGG CCT GTC TTC
494 AAA AGC ACT GAA CAA AAA TAT CTA ACC TTG AAT ACA GAG TCA ACA AGA
510 ATA ATG ACG AAA CTA CGT GCT CAA CAA TGT CGA TTC TGG ACA TCA TTT
                                EXON 3:INTRON 3
526 TTT CCA AAA GTC TTG GAA ATG ACA G gtgtgtctgt ttttagtgtt

tggttatttta atagatgatg ggtta .....atttttgatta atacaactta ttccatattt
INTRON 3:EXON 4
tacag      534GA

535 AAT ATT GAT GAA GCA GAA TGG GAG TGG AAA GCA GGA TTC CAT CGC TGG
551 AAC AAT TAC ATG ATG GAC TGG AAA AAT CAA TTT AAC GAT TAC ACT AGC
                                stop
567 AAG AAA GAA AGT TGT GTG GGT CTC taa

```

Figura 3. Sequência parcial de nucleotídeos do gene *BCHE* humano. O nucleotídeo +1 é o primeiro nucleotídeo da proteína madura (aminoácido Glu). Os 3 possíveis sítios de início da tradução são Met -69, Met -47 e Met -28. A sequência de aminoácidos do peptídeo sinal se inicia na Met -69. Os introns foram parcialmente sequenciados, as regiões não sequenciadas são indicadas por pontos. A proteína madura termina na Leu 574.

A estrutura tridimensional da AChE de *Torpedo californica* foi determinada por SUSSMAN et al. (1991). Ela consiste de uma proteína com 12 fitas β envolvidas por 14 α hélices.

Levando em consideração a grande homologia entre a BChE e a AChE, MILLARD e BROOMFIELD (1992) propuseram, por análise computacional, um modelo para a BChE humana com base na estrutura da AChE. Nesse modelo, observou-se, conforme esperado, uma grande similaridade entre as enzimas. Uma diferença encontrada entre elas foi a presença de apenas um resíduo aromático na BChE na entrada do túnel que leva ao sítio ativo (a AChE possui 3). Pela ausência de resíduos aromáticos, o sítio ativo é mais espaçoso do que o da AChE. Este modelo prevê, ainda, que as 9 cadeias de oligossacarídeos estão distantes da entrada do sítio ativo.

LOCKRIDGE et al. (1987a), em estudos de inibição das colinesterases por diisopropilfluorofosfato (DFP), mostraram que o nucleófilo presente no sítio esterásico da BChE humana está representado por um resíduo de serina, Ser198. SHAFFERMAN et al. (1992) identificaram, por estudos de mutagênese sítio-dirigida, Ser203, His447 e Glu334 como a tríade catalítica que forma o sítio ativo esterásico da AChE humana. Estes resíduos correspondem a Ser198, His438 e Glu325 na BChE humana. Esta tríade catalítica é semelhante à encontrada em outras serina-hidrolases, porém, nessas outras, ocorre um resíduo de aspartato ao invés de glutamato.

Durante muito tempo, tentou-se, sem sucesso, cristalizar a BChE humana purificada do plasma. Como a BChE humana é um homotetrâmero altamente glicosilado, os grupamentos de açúcar freqüentemente perturbam a cristalização. NACHON et al. (2002) descreveram a primeira estrutura em cristal da BChE humana. Essa estrutura foi obtida a partir de uma butirilcolinesterase humana recombinante, adequada para cristalização. Essa enzima teve 4 dos 9 sítios de N-glicosilação removidos (resíduos 17, 455, 481 e 486) e seu domínio de oligomerização deletado.

Após eletroforese bi-dimensional em papel filtro e em gel de amido pH 8,6, verifica-se que a enzima butirilcolinesterase aparece sob cinco formas moleculares principais: monômero (C_1), dímero (C_3) e tetrâmero (C_4), sendo também encontrado o

monômero ligado à albumina sérica (C_2) e o tetrâmero ligado à uma substância ainda desconhecida (C_5). O complexo C_5 é formado pela interação dos genes *BCHE* e *CHE2*. JUUL (1968), usando gel de poliacrilamida, encontrou 12 bandas eletroforéticas. O mesmo resultado foi obtido por ALCÂNTARA et al. (1999) e ALCÂNTARA (2000), sugerindo que a BChE possa estar ligada a diversas outras substâncias.

SOUZA et al. (2003) descreveram uma nova banda eletroforética com mobilidade igual à da banda C_5 , quando o pH do gel de ágar é cerca de 5,3 e com mobilidade igual à da banda C_4 , quando o pH é cerca de 6,7. Essa banda foi chamada de banda $C_{4/5}$ e não parece ser determinada por alelo de *CHE2* C5+*.

2.4. Função fisiológica da BChE

A função colinérgica da AChE na transmissão de impulsos nervosos é bem conhecida, mas apesar da grande homologia estrutural verificada entre AChE e BChE, a função fisiológica da BChE e seu substrato natural permanecem desconhecidos. Existem hipóteses que relacionam a BChE à condução nervosa lenta, à regulação de níveis de colina e acetilcolina no plasma, à proteção da acetilcolinesterase, à remoção de ésteres de colina produzidos no metabolismo, à assimilação de alimentos e ao metabolismo de lipídios (KUTTY, 1980, WHITTAKER, 1980 e 1986). Embora nenhuma função para esta esterase tenha sido estabelecida no metabolismo intermediário, nota-se que ela é muito eficiente em hidrolisar acetilcolina e em concentrações relativamente altas, e poderia contribuir fisiologicamente na hidrólise deste neurotransmissor sob circunstâncias especiais, tais como durante a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário (LAYER et al., 1992).

A BChE exibe uma atividade de aril acilamidase amino sensível (AAA), capaz de hidrolisar o substrato o-nitroacetato. Essa atividade de AAA é inibida por inibidores de colinesterases e também por 5-hidroxitriptamina (5HT; serotonina) e é estimulada por tiramina. A tiramina é sintetizada a partir da tirosina e estimula a liberação de adrenalina e noradrenalina. A enxaqueca está correlacionada com o excesso de tiramina, de modo que é possível especular uma função da atividade de AAA da BChE, onde a tiramina estimula essa atividade que degrada o analgésico endógeno,

sendo modulada negativamente pela 5HT (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

Uma correlação positiva entre a alta proporção proliferativa e a expressão da BChE foi observada em neuroblastos do tubo neural, crista neural, células da retina e outros tipos celulares (LAYER et al., 1992). Esses autores sugerem que as funções não sinápticas da BChE e da acetilcolinesterase (AChE) estão relacionadas com crescimento celular, diferenciação e mobilidade dos axônios e com a regulação da expressão da AChE. Outros estudos têm ainda sugerido que preparações de BChE purificada apresentam uma ação mitogênica em diferentes tipos de células neurais cultivadas *in vitro*, provocada pela atividade esterolítica da BChE (LAYER, 1996).

O loco *BCHE* apresenta diferentes mutações responsáveis pela ausência total ou por níveis inferiores a 10% dos níveis normais de atividade enzimática no plasma, caracterizando o fenótipo silencioso. A frequência desse fenótipo é de cerca de 1/100.000 e os indivíduos portadores dessas mutações são fisiologicamente normais, o que pode servir de contra argumento quanto à existência de uma função fisiológica vital para a BChE (WHITTAKER, 1986). É sabido, porém, que a desativação (“knockout”) de muitos genes não produz efeitos fenotípicos óbvios, pois os sistemas biológicos possuem mecanismos redundantes. Desse modo, é possível que, em indivíduos com fenótipo silencioso, outras enzimas, como a AChE ou outras esterases, possam exercer a função da BChE (SMALL, 1995).

Embora existam diversos estudos que fornecem muita informação a respeito das similaridades entre a AChE e a BChE, da distribuição intra e inter-específica, das propriedades químicas e da variabilidade molecular da BChE, nenhuma hipótese mostrou-se conclusiva em relação à função e ao substrato natural da enzima.

2.5. Atividade da BChE

Vários fatores foram associados com alterações na atividade da enzima butirilcolinesterase, como por exemplo, estrógenos (correlacionados negativamente com a atividade da BChE), peso, índice de massa corporal e obesidade, diabetes do

tipo II e o fenótipo CHE2 C5+ (correlacionados positivamente com a atividade da BChE).

STUEBER et al. (1985) mostraram associação positiva entre a atividade da BChE e peso, enquanto CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) verificaram média de peso inferior (cerca de 6 kg a menos) em indivíduos CHE2 C5+ de banda C₅ forte, quando comparados a seus controles CHE2 C5-. Nesse mesmo estudo foi encontrada correlação positiva entre peso e atividade da BChE no grupo de fenótipo CHE2 C5+ de banda fraca e ausência de correlação no grupo de fenótipo CHE2 C5+ de banda forte. No grupo de fenótipo CHE2 C5+ de banda fraca não foi verificada diferença na média de peso com relação ao grupo controle de fenótipo CHE2 C5-.

Entre os indivíduos com o fenótipo CHE2 C5-, ALCÂNTARA (2000) verificou correlação significativa entre a atividade total (AT) da butirilcolinesterase e as seguintes variáveis independentes: peso (+), estocagem (-), altura (-), sexo, grupo étnico e idade (+) quando essa variável foi colocada como dependente na análise de regressão múltipla. Nesse estudo foi mostrado que se pessoas de diferentes sexos possuem o mesmo peso, altura e idade, espera-se que as de sexo masculino possuam, em média, maiores valores de AT da BChE. Da mesma forma, levando-se em conta pareamento para peso, estocagem, altura, idade e sexo, os euro-brasileiros apresentam, em média, maiores valores de AT da BChE, em relação a afro-brasileiros miscigenados.

ALCÂNTARA (2000) encontrou efeito positivo da idade sobre a atividade da BChE, como também já tinha sido observado por PROPERT e BRACKENRIDGE (1976), CHAUTARD-FREIRE-MAIA (1989) e CROOK et al. (1994).

2.6. Nomenclatura

Recentemente, um sistema de nomenclaturas tem sido sugerido para a descrição de alterações nas seqüências de DNA e de proteínas (DEN DUNNEN e ANTONARAKIS, 2000). Estas recomendações têm sido amplamente aceitas e estimularam a descrição mais uniforme e inequívoca de alterações de seqüências.

A nomenclatura deve ser acurada e não ambígua, mas flexível e a troca de nucleotídeo deve sempre estar incluída no relato original (DEN DUNNEN e ANTONARAKIS, 2000).

No presente trabalho foram seguidas algumas recomendações de DEN DUNNEN e ANTONARAKIS (2000):

- Deve ser evitado relatar mudanças ao nível do aminoácido sem incluir a descrição ao nível do nucleotídeo.
- Codóns de término são designados por X.
- O código de uma letra do aminoácido é recomendado, código de três letras é aceitável.
- Mudanças de aminoácidos são descritas no formato: código do aminoácido alterado; número do aminoácido; código do novo aminoácido.
- Deleções são designadas por “del” depois do número do aminoácido.
- Inserções são designadas por “ins” depois do número do aminoácido, seguidas pelos aminoácidos inseridos.
- Mudanças na matriz de leitura são indicadas por fs.

No presente trabalho, para facilitar o entendimento, ao referir-se ao nucleotídeo do tipo usual, utilizou-se apenas a letra *U*.

2.7. Variabilidade genética do loco *BCHE*

A BChE é uma enzima polimórfica codificada pelo gene *BCHE* (Tabela 1). O uso da succinilcolina como relaxante muscular pré-operatório, na década de 50, possibilitou a descoberta da variabilidade dessa enzima.

A primeira enzima variante descrita (atípica; *D70G*) não consegue hidrolisar esse relaxante, em doses farmacológicas, o que causa nos pacientes paralisia muscular e apnéia prolongadas.

Poucos fenótipos são identificados por testes de inibição enzimática (KALOW e STARON, 1957).

Tabela 1. Variantes do gene *BCHE*

Troca de nucleotídeo	Nome ^a	Referência
Exon 1		
-116; G->A		Bartels et al. [1990]
Exon 2		
9 to 11; CATCAT->CAT	<i>I4del</i>	Maekawa et al. [1997]
16; ATT-> TT	<i>I6fs</i>	Bartels et al. [1992b]; Primo-Parmo et al. [1996]
71; ACG->ATG	<i>T24M</i>	Maekawa et al. [1997]
82; TTT->ATT	<i>F28I</i>	Yen et al. [2003]
98; TAT->TGT	<i>Y33C</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
109; CCT->TCT	<i>P37S</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
208; GAT->CAT	<i>D70H</i>	Boeck et al. [2002]
209; GAT->GGT	<i>D70G (A)</i>	McGuire et al. [1989]
223; GGC->CGC	<i>G75R</i>	Souza et al. [no prelo]
270; GAA->GAC	<i>E90D</i>	Souza et al. [no prelo]
286; AAT ->TAT	<i>N96Y</i>	Yen et al. [2003]
297; ATT->ATG	<i>I99M</i>	Souza et al. [no prelo]
298; CCA->TCA	<i>P100S</i>	Maekawa et al. [1997], Takagi et al. [1997], Lu et al. [1997]
318; AAT->AAAT	<i>N106fs</i>	Yen et al. [2003]
344; GGT->GAT	<i>G115D</i>	Primo-Parmo et al. [1997]
351; GGT->GGAG	<i>G117fs</i>	Nogueira et al. [1990]
355; CAA->TAA	<i>Q119X</i>	Sudo et al. [1996]
375; TTA->TTT	<i>L125F</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
383; TAT->TGT	<i>Y128C</i>	Hidaka et al. [1997a]
424; GTG->ATG	<i>V142M (H)</i>	Jensen et al. [1992]
486;GCT->GCC	<i>A162A</i>	Souza et al. [no prelo]
510; GAT->GAG	<i>D170E</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
514; CAG->TAG	<i>Q172X</i>	Gätke et al. [2001]
551; GCC->GTC	<i>A184V (SC)</i>	Greenberg et al. [1995]
592; AGT->GGT	<i>S198G</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
596; GCA->GTA	<i>A199V</i>	Sakamoto et al. [1998]
601; GCA->ACA	<i>A201T</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
607; TCA->CCA	<i>S203P</i>	Hidaka et al. [2001]
728; ACG->ATG	<i>T243M (F-1)</i>	Nogueira et al. [1992]
748; ACT->CCT	<i>T250P</i>	Maekawa et al. [1995]
765; GAG->GAC	<i>E255D</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
800; AAA->AGA	<i>K267R</i>	Maekawa et al. [1997]
811; GAA->TAA	<i>E271X</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
943; ACC->AACC	<i>T315fs</i>	Hidaka et al. [1992]
943; ACC->TCC	<i>T315S</i>	Liu et al. [2002]
988; TTA->ATA	<i>L330I</i>	Sudo et al. [1997]
1062 - 1076	<i>K355insALU</i>	Muratani et al. [1991]
1093; GGA->CGA	<i>G365R</i>	Hada et al. [1992], Hidaka et al. [1992]
1156; CGT->TGT	<i>R386C</i>	Yen et al. [2003]

Continua

1169; GGT->GTT	<i>G390V</i> (F-2)	Nogueira et al. [1992]
1200; TGC->TGA	<i>C400X</i>	Hidaka et al. [1997b]
1253; TTC->TCC	<i>F418S</i>	Maekawa et al. [1995]
1270; CGA->TGA	<i>R424X</i>	Yen et al. [2003]
1273; TCC->CCC	<i>S425P</i>	Gnatt et al. [1990]
1303; GGA->AGA	<i>G435R</i>	Dey et al. [1997]
1336; TTT->GTT	<i>F446V</i>	Dey et al. [1998]
1351; GAA->TAA	<i>E451X</i>	Dey et al. [1998]
1378; GAG->AAG	<i>E460K</i>	Yen et al. [2003]
1393; AGA->TGA	<i>R465X</i>	Maekawa et al. [1995]
1411; TGG->CGG	<i>W471R</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
<i>Intron 2</i>		
IVS2-8T>G		Primo-Parmo et al. [1996]
<i>Exon 3</i>		
1490; GAA->GTA	<i>E497V</i> (J)	Bartels et al. [1992a]
1500; TAT->TAA	<i>Y500X</i>	Bartels et al. [1992b], Primo-Parmo et al. [1996]
1543; CGT->TGT	<i>R515C</i>	Maekawa et al. [1995]
1553; CAA->CTA	<i>Q518L</i>	Primo-Parmo et al. [1996]
<i>Exon 4</i>		
1615; GCA->ACA	<i>A539T</i> (K)	Bartels et al. [1992b]
1914; A->G		Bartels et al. [1990]

^a Nome comum entre parênteses.

FONTE: Souza et al.(no prelo).

O uso dos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 (dimetilcarbamato de brometo de 2-hidroxi-5-fenil-benziltrimetilamônio), com o substrato acetato de α -naftila (ALCÂNTARA et al., 1991; PICHETH et al., 1994) identifica o alelo *D70G* e o fenótipo resistente ao fluoreto. Dibucaína e fluoreto de sódio também têm sido utilizados como inibidores para evidenciar variantes fenotípicas da BChE.

Uma classificação baseada nas variantes da enzima foi proposta por PRIMO-PARMO (1993). As variantes ditas qualitativas, determinam proteínas diferentes da enzima normal, chamada usual, por serem identificadas por métodos de inibição enzimática; as variantes quantitativas apresentam características similares à usual, mas estão presentes no plasma em concentrações mais baixas e só podem ser detectadas por testes de inibição em algumas combinações genotípicas; as variantes silenciosas têm atividade inferior a 10% do nível da enzima usual.

A seguir serão feitas descrições a respeito das primeiras variantes relatadas.

2.7.1. Variante *D70G*

A forma atípica (A; *D70G*), também chamada de resistente à dibucaína, foi a primeira variante genética a ser identificada. Foi inicialmente detectada em pacientes submetidos a doses fisiológicas de succinilcolina, utilizada como relaxante muscular pré-operatório. Esses pacientes, devido à incapacidade da enzima atípica da BChE de hidrolisar succinilcolina, sofriam de paralisia muscular e apnéia respiratória prolongadas. McGUIRE et al. (1989) mostraram que o alelo atípico *D70G* resulta de uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 (exon2), levando à uma substituição do ácido aspártico 70 (GAT) por glicina (GGT).

LOCKRIDGE e LA DU (1978) verificaram que a variante *D70G* apresenta afinidade reduzida frente a inibidores e substratos carregados positivamente, enquanto não demonstra alterações de afinidade por substratos neutros.

Existem diversos estudos populacionais da frequência da variante atípica da BChE. MCGUIRE et al. (1989) estimaram a frequência do alelo *D70G* em população caucasóide em cerca de 2%.

2.7.2. Variante *A539T*

A enzima variante *A539T*, ou variante K, é caracterizada por uma redução de cerca de 30% no número de moléculas circulantes que pode ser devida a menores níveis de síntese ou à sua degradação acelerada (RUBINSTEIN et al., 1978). A variante *A539T* é causada por uma mutação de ponto, no exon 4, que causa a substituição da alanina (GCA) por treonina (ACA) na posição 539 (BARTELS et al., 1992b). BARTELS et al. (1992b) verificaram ainda que a variante *D70G* encontra-se em cis com a variante *A539T* em 89% dos casos da mutação atípica.

Os estudos populacionais, baseados em análise direta de DNA, mostram que o alelo *A539T* é o mais freqüente dentre as variantes não-usuais da BChE (SOUZA et al., 1998), nos grupos étnicos europeu, africano e asiático já estudados, variando de cerca de 18% a 20% nessas populações não isoladas.

2.7.3. Variante *E497V*

O fenótipo J no qual foi encontrada a mutação *E497V* da BChE apresenta uma queda de cerca de 66% da enzima circulante e, conseqüentemente, um decréscimo correspondente na atividade enzimática total. BARTELS et al. (1992a) encontraram o fenótipo J associado a duas mutações de ponto na região codificadora do gene da BChE. Uma das mutações correspondia àquela previamente identificada (BARTELS et al., 1992b) como mutação *A539T* (GCA → ACA; Ala539→Thr) e a outra, denominada mutação *E497V*, localizava-se no nucleotídeo 1490, alterando o aminoácido 497 de ácido glutâmico para valina (Glu497 → Val). Como a variação *E497V* só foi encontrada em desequilíbrio máximo de ligação com a variante *A539T*, o efeito isolado do alelo *E497V* é ainda desconhecido. Não há relato sobre a freqüência populacional dessa variante.

2.7.4. Variantes *T243M* e *G390V*

As variantes resistentes ao fluoreto, assim como a variante *D70G*, são incapazes de hidrolisar succinilcolina em doses farmacológicas, devido a alterações na estrutura da enzima. Os fenótipos das variantes *T243M* e *G390V* são caracterizados por meio de

inibição enzimática, sendo resistentes à inibição pelo fluoreto e mostrando menor inibição pela dibucaína (HARRIS E WHITTAKER, 1961) e pelo propranolol (ALCÂNTARA et al., 1991; PICHETH et al., 1994), do que a BChE usual.

A variante *T243M*, denominada F-1 (variante resistente ao fluoreto), é causada por uma mutação de ponto que altera a treonina 243 (ACG) para metionina (ATG) e a variante fluoreto 2 (*G390V*) é causada por uma mutação de ponto que altera a glicina 390 (GGT) para valina (GTT; NOGUEIRA et al., 1992).

A frequência conjunta dos dois alelos, identificados por inibição enzimática, é de cerca de 0,5% na maioria das populações estudadas (WHITTAKER, 1986).

2.7.5. Variante *V142M*

O fenótipo H foi identificado por WHITTAKER e BRITTEN (1987) em dois pacientes em Londres, que mostravam uma queda de 90% na atividade da BChE. Estes pacientes apresentavam alta sensibilidade à succinilcolina e pareciam ser heterozigotos para o alelo atípico (*D70G*) e para o alelo usual (*U*), com base em dados de atividade e inibição enzimática.

Mais tarde, verificou-se que esta variante apresenta uma mutação de ponto no nucleotídeo 424, levando a uma troca da valina 142 pela metionina (*V142M*; JENSEN et al., 1992). A mutação *D70G* foi encontrada em cis nos quatro indivíduos portadores da mutação *V142M*.

2.7.6. Variante *A184V*

O fenótipo SC, resistente à succinilcolina, é determinado pela variante *A184V*, sendo identificado por GREENBERG et al. (1995) em uma paciente norte-americana. Essa paciente apresentava número de dibucaína e atividade enzimática normais e uma sensibilidade aumentada à succinilcolina. A variante *A184V* condiciona uma enzima com capacidade diminuída em hidrolisar succinilcolina, mas com habilidade normal em hidrolisar outros substratos e resistência normal a inibidores convencionalmente utilizados.

Não há relato sobre a frequência populacional dessa variante.

2.7.7. Variantes silenciosas

O fenótipo silencioso da BChE é caracterizado por uma queda de mais de 90% da atividade da enzima em relação à média do fenótipo usual, podendo chegar à ausência total de atividade enzimática.

LIDDELL et al. (1962) foram os primeiros a descrever um caso de deficiência completa da atividade da BChE, revelando a existência de um homozigoto silencioso. Posteriormente, vários alelos silenciosos foram identificados por análise de DNA (NOGUEIRA et al., 1990; MURATANI et al., 1991; HADA et al., 1992; HIDAKA et al., 1992; HIDAKA e IUCHI, 1995; MAEKAWA et al., 1995 e 1997; PRIMO-PARMO et al., 1996; SUDO et al., 1996 e 1997; SAKAMOTO et al., 1998, entre outros).

A grande variedade de alelos silenciosos, identificados em um número relativamente pequeno de pacientes, indica uma alta heterogeneidade do fenótipo silencioso da BChE.

2.8. Variantes raras e determinação da atividade

A atividade média da BChE de heterozigotos para uma variante não usual é, geralmente, mais baixa que a da enzima usual. Um modo de avaliar a atividade de uma enzima mutante é examiná-la em um indivíduo homozigoto para essa mutação. Contudo, muitos desses genótipos homozigotos são muito raros. Assim, para verificar o fenótipo correspondente é necessário criar um estado homozigoto para esta mutação e analisar sua expressão em um tipo celular sem BChE endógena. Essa abordagem experimental foi inicialmente feita para a variante *G390V* (MASSON et al., 1993) e, em seguida, para muitas outras variantes (PRIMO-PARMO et al., 1996; LIU et al., 2002).

3. OBJETIVOS

- 1** - Descrever a variabilidade nos exons 2 e 4 do gene *BCHE* em doadores de sangue de Curitiba, visando à detecção de mutações ainda não descritas.
- 2** - Estimar as frequências das variantes encontradas e verificar o grau de desequilíbrio de ligação entre elas.
- 3** - Caracterizar, por análise da enzima produzida por expressão gênica *in vitro*, parâmetros bioquímicos de atividade enzimática condicionados pelas variantes novas não sinônimas, encontradas no presente estudo e no trabalho de SOUZA (2001).
- 4** – Avaliar o efeito das trocas de aminoácidos nas variantes novas, descritas no presente estudo, utilizando recursos computacionais para determinação da estrutura terciária de proteínas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Amostra da população

O projeto de pesquisa sobre variabilidade da butirilcolinesterase foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP; protocolo nº. 2063).

As amostras dos doadores de sangue foram selecionadas de cerca de 3.000 amostras de sangue do banco do Laboratório de Polimorfismo e Ligação, colhidas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR).

Para a seleção dos indivíduos foram utilizados os seguintes critérios:

- 1) Sexo, idade, índice de massa corporal (IMC) e raça: dessa seleção, constituiu-se uma amostra de 645 doadores de sangue, euro-brasileiros, do sexo masculino, de idade entre 18 e 30 anos, com $20 \leq \text{IMC} \leq 25$.
- 2) Fenotipagem do gene *CHE2*: os 645 indivíduos selecionados foram analisados quanto ao loco *CHE2* para a exclusão daqueles que apresentavam fenótipo *CHE2* C5+.
- 3) Atividade enzimática da BChE: os indivíduos que apresentaram fenótipo *CHE2* C5– foram examinados para a atividade enzimática. A partir da curva de distribuição de atividade selecionaram-se 392 indivíduos para a análise do DNA. Esses indivíduos foram separados em três grupos de atividade: baixa, média e alta.

Foi possível realizar a análise de DNA de 370 amostras, pois para algumas amostras não havia DNA armazenado em nosso laboratório. No caso de algumas amostras, alguns fragmentos do DNA já tinham sido examinados por SOUZA (2001), em nosso laboratório.

4.1.2. Variantes detectadas em outros estudos

Foi feito o estudo de expressão gênica de três mutações novas, anteriormente seqüenciadas (SOUZA et al., no prelo), e que foram detectadas durante a pesquisa da tese de SOUZA (2001). Essas mutações são as seguintes: *G75R*, *E90D* e *I99M*.

4.2 Metodologia

4.2.1 Fenotipagem do loco *CHE2* - Eletroforese em gel de ágar ácido

Para a determinação dos fenótipos do loco *CHE2* foi utilizada a técnica desenvolvida por ROBINSON et al. (1957), modificada por VAN ROS E VERVOORT (1973) para aplicação dessa técnica à BChE. Adaptações subseqüentes foram feitas por FADEL PICHETH (1991) e SOUZA (1995).

O gel de ágar foi preparado, utilizando-se uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38. Esta solução foi aquecida por cerca de sete minutos ou até a completa dissolução do ágar, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento, a solução foi vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm para seu completo resfriamento e, então, o gel foi colocado na geladeira e mantido em repouso durante a noite. Após esse período de repouso, as amostras de plasma (1,5 µL) foram aplicadas no gel, com o auxílio da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm). A placa contendo as amostras foi então submetida à eletroforese em tampão citrato pH 6,7, por três horas e meia. A corrida eletroforética foi realizada a 4°C com cerca de 75 V e 35 mA. Após a corrida eletroforética foi despejado o cromógeno-substrato sobre a placa. A solução cromógeno-substrato foi preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (Sigma F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (Na_2HPO_4 0,134 M e NaH_2PO_4 0,066 M) e solução de α -naftilacetato 0,75 mM. A placa com o cromógeno-substrato foi incubada por uma hora a 37°C e após a revelação das bandas, a placa foi lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel foi então colocado entre uma folha de papel sulfite e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro, e levado à estufa a 37°C até a completa secagem. Para se retirar o excesso de umidade, a folha de papel filtro foi trocada após 10 minutos.

4.2.2 Atividade da BChE

A técnica utilizada foi a de DIETZ et al. (1973), modificada por EVANS E WROE (1978), cujo princípio é a hidrólise da propioniltiocolina pela BChE,

produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'- ditio-bis 2 nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A medida de atividade enzimática foi realizada a 25°C e a leitura feita em 410 nm.

A. Reagentes

a) Tampão fosfato, pH 7,6.

Solução A: fosfato dibásico de sódio anidro 33,3 mM.

Solução B: fosfato diácido de potássio anidro 100 mM.

Ajustar, com a solução B, o pH da solução A. Guardar o tampão na geladeira.

b) Reagente de cor DTNB (0,423 mM) dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL.

c) Substrato de Propioniltiocolina 100 mM: é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

B. Técnica

Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB, 0,05 mL de substrato e 0,25 mL de soro (1/100 em água destilada) foram mantidos por três minutos no banho-maria a 25°C antes da leitura em espectrofotômetro (o aparelho é zerado com água destilada). A primeira leitura, chamada A0, foi efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 foram efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, foi calculado o valor de ΔA (variação da absorbância por minuto).

$$\Delta A/\text{min} = \frac{(A1 - A0) + (A2 - A1) + (A3 - A2)}{3}$$

$$U/\text{mL} = \Delta A/\text{min} \times 73,53$$

Cálculo do Fator:

$$\frac{1}{E_{410 \text{ nm}} \times d} \times \frac{VT}{VA} = 73,53$$

onde:

$E_{410 \text{ nm}}$ = coeficiente de absortividade molar do DTNB em cubeta de 1 cm

$$a_{410\text{ nm}} = 13,6 \text{ (L.mmol}^{-1}\text{.cm}^{-1}\text{)}$$

d = diâmetro da cubeta (1 cm)

VT = volume total da cubeta (2,5 mL)

VA = volume da amostra (0,0025 mL)

Definição de unidade: 1 U/L corresponde à degradação de 1 μMol de substrato por minuto por litro de soro.

$$\text{Atividade (KU/L)} = \Delta A/\text{min.} \times 73,53 \times 1.000$$

4.2.3. Detecção de variantes do gene *BCHE*

4.2.3.1. Extração do DNA

A técnica utilizada para extração do DNA foi a de LAHIRI e NURNBERGER (1991), com modificações. Foram coletados 10 mL de sangue em EDTA e o creme de leucócitos acrescido de suspensão de hemácias foi estocado a -20°C . Desse material descongelado foi retirado o creme de leucócitos o qual foi ressuspendido em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl_2 0,01 M; EDTA 0,002 M) e 125 μL de IGEPAL CA-630. Em seguida, centrifugou-se a 2500 rpm por 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e completou-se o volume novamente para 10 mL com TKM1. A centrifugação e a ressuspensão em TKM1 foram repetidas até que o precipitado ficasse bem claro. Ressuspendeu-se delicadamente o precipitado, foram adicionados 800 μL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl_2 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M) e agitou-se bem. Adicionaram-se 50 μL de SDS (10%). As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante a noite toda. Após esse período, as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionaram-se 300 μL de NaCl saturado (6 M). Centrifugou-se a 12000 rpm por 20 minutos sendo o sobrenadante passado para um tubo de ensaio e adicionados dois volumes de etanol 100%, gelado, para um volume de sobrenadante. O tubo foi tampado e invertido várias vezes (delicadamente) até ocorrer a precipitação do DNA. O DNA foi coletado utilizando-se uma micropipeta com ponteira de ponta cortada e foi colocado em um tubo de 1,5 mL. Lavou-se o DNA obtido com etanol 70%, dispensando posteriormente o álcool. O tubo

foi colocado aberto na estufa a 37°C para que ocorresse a evaporação do álcool. Ressuspendeu-se o DNA em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH 8,0 0,01M e EDTA pH 8,0 0,001M) e deixou-se em banho-maria a 55°C por 3 dias. Após três dias na geladeira, o DNA estava pronto para o uso e podia ser congelado. Também foi utilizado DNA já estocado a -20°C.

4.2.3.2. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As amplificações foram realizadas com volume de 10 µL de volume total de reação, contendo 9 µL de PCR supermix (Invitrogen - 22 mM Tris-HCl pH 8,4; 55 mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 220 µM dATP; 220 µM dTTP; 220 µM dCTP; 220 µM dGTP; 22 U/mL Taq DNA polimerase), 1 µL de DNA (cerca de 150 ng) e 10 pmoles de cada iniciador. As PCRs foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 ou Techgene Ftgene2D e os ciclos de amplificação foram os mesmos para cada par de iniciadores utilizados, programados do seguinte modo para o MJ Research PTC-100:

1) 80°C por 1 min.; 2) 94°C por 1 min.; 3) 48°C por 1 min.; 4) 72°C por 1 min.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C por 10 min.

Para o termociclador Techgene Ftgene2D, os ciclos de amplificação foram:

1) 80°C por 30 segs.; 2) 94°C por 30 segs.; 3) 48°C por 30 segs.; 4) 72°C por 30 segs.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C por 10 min.

Com o uso dessa técnica, foram analisados os exons 2 e 4 que representam 87% da região codificadora do gene *BCHE*.

4.2.3.2.1. PCR – Exon 2

O exon 2 foi amplificado utilizando-se oito pares de iniciadores (Tabela 2). De acordo com o fragmento analisado foram utilizados os seguintes iniciadores:

1. Nt -42 (intron 1) a 204: P15 e E2N13
2. Nt 155 a 347: N25 e N23
3. Nt 304 a 535: E2N35 e E2N33
4. Nt 481 a 719: E2N45 e P13
5. Nt 659 a 876: P25 e N53

Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA na técnica de SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples).

Nome e localização	Sequência do iniciador	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
P15 - nt -42 a -23	TGG TTT CTT TTG CTC TGC AT	246	1
E2N13 - nt 185 a 204	GTT CTG ACA GCA AGA ATT TG		3
N25 - nt 155 a 172	GG TCT GAT ATT TGG AAT G	196	2
N23 - nt 330 a 347	CCA CCA TAA ATC CAT ATC		2
E2N35 - nt 304 a 323	CCT AAA CCA AAA AAT GCC AC	232	3
E2N33 - nt 516 a 535	GAA CCC ACT GAA GAG CCA AC		3
E2N45 - nt 481 a 501	GAG GCT CCA GGG AAC ATG GGT	239	3
P13 - nt 697 a 719	CT AGC TTC ATA AAG AGA TGT TAC		2
P25 - nt 659 a 678	CC ATT CTG CAA AGT GGA TCC	218	2
N53 - nt 859 a 876	CGG ACC AAA GTT TAC TGA		2
E2N65 - nt 835 a 854	GTT GTC CCC TAT GGG ACT CC	225	3
E2N63 - nt 1040 a 1059	ACC TTC CTG AAA TTC TTT TC		3
N75 - nt 1000 a 1017	GCT CCT GGC TTC AGC AAA	236	2
N73 - nt 1218 a 1235	CA TTC TGA GAA CTT CTT G		2
E2N85 - nt 1194 a 1212	CAT ATG CCC TGC CTT GGA G	269	3
P23M - nt 11 a 29 a jusante da junção exon 2/intron 2	GAG AAC AAT GAC AAA AAA TC		3
55- nt -31 a -12 a montante da junção intron 3/exon 4	TGA TTA ATA CAA CTT ATT CC	189	1
53 - nt 1738 a 1758	GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG		1

Referências: 1- HÖHLER et al. (1995); 2- SOUZA (2001); 3- Presente trabalho.

6. Nt 835 a 1059: E2N65 e E2N63
7. Nt 1000 a 1235: N75 e N73
8. Nt 1194 a 29 (intron 2): E2N85 e P23M

4.2.3.2.2. PCR – Exon 4

Para o exon 4 foram utilizados os iniciadores 55 e 53 (Tabela 2), que amplificam o fragmento de DNA compreendido entre os nucleotídeos –31 (intron 3) a 1758.

4.2.3.3. Análise do DNA amplificado

4.2.3.3.1. SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)

A técnica de SSCA foi originalmente descrita por ORITA et al. (1989). Essa técnica consiste na análise da fita simples do produto amplificado, gerada por desnaturação do DNA. Esta técnica permite a detecção de alterações conformacionais no DNA que podem ser geradas por apenas uma mutação de ponto, podendo ser percebidas pela modificação da mobilidade eletroforética do DNA em fita simples.

Após a amplificação, 5 µL de cada amostra foram misturados a 7 µL de solução tamponante (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 µL de EDTA 0,4 M, 16,7 µL de NaOH 3 M e 108,3 µL de água bidestilada) e, depois, mantidos a 94°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. A concentração do gel, as condições do preparo e o tempo de corrida foram variáveis para cada fragmento (Tabela 3). O gel, para um volume final de 30 mL, era preparado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 29:1 (29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100 mL) ou de uma solução estoque de poliacrilamida 49:1 (49 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100 mL), acrescida de 250 µL de persulfato de amônio 10% e 30 µL de TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamina). A solução para preparo do gel era de TBE 1X (Tris borato

Tabela 3. Condições das eletroforeses de SSCA para os diferentes fragmentos do gene *BCHE*

Fragmento (nt)	% T ¹	% C ²	pH ³	Pré-corrida ⁴	Tempo de corrida
Exon 2					
–42 (intron 1) a 204	9	3,4	3,66	sim	3h 30 min
155 a 347	9	3,4	3,66	sim	4 h
304 a 535	8	3,4	3,66	sim	3 h 30 min
481 a 719	8	3,4	3,66	sim	4 h
659 a 876	10	2	8,2 ⁵	sim	4 h 30 min
835 a 1059	8	3,4	3,66	sim	4 h
1000 a 1235	9	3,4	8,2 ⁵	sim	6 h
1194 a 29 (intron 2)	9	3,4	3,66	não	4 h
Exon 4					
–31 (intron 3) a 1758	8	3,4	8,2 ⁵	sim	4 h 30 min

Os valores da voltagem e da amperagem foram mantidos constantes em 250 V e 35mA, respectivamente, para todos os fragmentos analisados.

¹ Concentração de acrilamida.

² Proporção de bisacrilamida em relação ao total de acrilamida.

³ Refere-se ao pH da solução empregada para preparar o gel.

⁴Pré-corrida refere-se aos 15-40 minutos de corrida eletroforética sem a aplicação das amostras de DNA.

⁵ Eletroforeses contínuas, sendo as demais descontínuas.

89m M e EDTA 0,01 M, pH 8,0) ou de Tris 33 mM, pH 3,66. No primeiro caso, a eletroforese foi contínua e, no segundo, foi descontínua, tendo-se também utilizado tampão TBE 1X na cuba eletroforética.

4.2.3.3.2. Coloração do gel

A revelação do gel foi realizada em etapas (BUDOWLE et al., 1991), durante as quais ele foi mantido sob agitação. Após a eletroforese, o gel foi colocado em um recipiente e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1%) durante três minutos. Foi, então, lavado duas vezes com água destilada e imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) por 20 minutos. Após duas lavagens com água destilada, o gel foi imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96% e 92 µL de formaldeído) até que o líquido escurecesse. Depois da retirada do líquido escurecido, acrescentou-se o restante da solução reveladora e o gel foi mantido imerso até que as bandas de DNA aparecessem. Quando a revelação estava terminada, o gel foi lavado duas vezes com água destilada e mantido em solução de ácido acético (10%) por cinco minutos. Lavou-se, então, por duas vezes com água destilada e acrescentou-se solução aquosa de glicerol (5%), na qual o gel foi mantido por, pelo menos, dez minutos. Antes da secagem, o gel era embebido em solução de metanol (30%) e glicerol (1%) e colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução. O papel celofane foi mantido esticado sobre uma superfície lisa para que não se formassem bolhas de ar que prejudicam a secagem. Após ser colocado sobre o celofane, o gel foi coberto com uma folha de papel filtro e levado a uma prensa forrada com papel filtro, permanecendo até o dia seguinte, quando foi levado ao secador a vácuo, onde foi conservado até estar completamente seco.

4.2.3.3.3. SSCA para a diferenciação das mutações *T243M* e *E255D*

Quando se realizou a eletroforese em gel de poliacrilamida para o fragmento entre os nucleotídeos 659 e 876, nas condições já mencionadas, não foi possível a diferenciação das mutações já descritas, *T243M* e *E255D*, visto que ambas apresentavam o mesmo padrão de bandas. A fim de que essa diferenciação fosse

possível, sem a utilização de enzima de restrição específica ou seqüenciamento das amostras, foi feito um gel de poliacrilamida nas seguintes condições: T = 11%; C = 3,4%; pH 3,66 da solução de preparo do gel; 250 V; 35 mA; pré-corrida = 20 minutos; tempo de corrida = 6 h.

4.2.3.4. Seqüenciamento de DNA

As amostras, cujas variações detectadas por SSCA diferiam dos controles usados, tiveram o DNA seqüenciado a partir do produto purificado da PCR, utilizando-se o seqüenciador automático ABI 377 com o Big Dye Terminator Cycle Kit (Applied Biosystems) ou o seqüenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis Systems com o Dyanamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences). Para cada amostra, foram feitas no mínimo 4 leituras, sendo que tanto a fita “sense” como a “antisense” foram lidas. Os iniciadores utilizados para as reações de seqüenciamento estão listados na Tabela 4.

4.2.3.4.1. Purificação do DNA

A técnica de purificação permite a remoção de fragmentos de DNA indesejáveis, tais como excesso de iniciadores e fragmentos de DNA que não tenham sido totalmente amplificados, para possibilitar posterior seqüenciamento. O seguinte procedimento foi utilizado:

1. Foi acrescentado acetato de amônio 7,5 M (28,9 g de acetato de amônio em água ultra pura para volume final de 25 ml) correspondendo a 2/3 do volume do produto de PCR.
2. Adição de etanol absoluto correspondendo a duas vezes e meia o volume anterior.
3. As amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos.
4. Centrifugou-se a 14 000 rpm durante 20 minutos.
5. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 250 µl de etanol 70% (700 µl de etanol e 300 µl de água ultra pura).

Tabela 4. Iniciadores utilizados nas reações de seqüenciamento do exon 2, com suas respectivas seqüências de nucleotídeos.

Iniciador	Nt ^a	Seqüência de nucleotídeos	Ref.
AP4 kpn+	35 (intron 2)	5' AAGCCAGAGAACAATGAAAAAATCAGCA CTTAC 3' (antisense)	1
P13	719	5' CTAGCTTCATAAAGAGATGTTAC 3' (antisense)	2
P15	-42	5' TGGTTTCTTTTGCTCTGCAT 3' (sense)	3
P23	29 (intron 2)	5' GAGAACAAATGACAAAAAATC 3' (antisense)	4
P25	659	5' CCATTCTGCAAAGTGGATCC 3' (sense)	2
AP3 Hind	-82	5' CAAGCTTGGCAAAGTCACAATCATA TGCATCAGATTTCTCTTT 3' (sense)	1
XbaI	750	5' ACTGGTTGCTCTAGAGAGAATGAG AC 3' (sense)	1

^aNucleotídeo em que ocorre o início da hibridação dos iniciadores.

Referências: 1- Instituto Eppley da Universidade do Nebraska; 2- SOUZA (2001); 3- HÖHLER et al. (1995); 4- Presente trabalho.

6. Ressuspenderam-se as amostras em 15 µl de tampão TE.
7. As amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm durante 20 minutos.
8. Descartou-se o sobrenadante e secaram-se as amostras em dessecador a vácuo.

Depois das amostras terem sido purificadas, o DNA foi quantificado comparando-se com o padrão de massa molecular (Low DNA MASS Ladder – Gibco BRL). Essa comparação foi feita aplicando-se 2 µl de corante xileno cianol (Tris 50 mM pH 7,6, EDTA 5 mM, SDS 5%, xileno cianol 0,1%, sucrose 28%) e 2 µl das amostras em gel de agarose 2% e procedendo-se a corrida eletroforética por 50 minutos a 80V. A coloração do gel foi feita com brometo de etídeo durante 15 minutos.

4.2.3.4.2. Reação de seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento, em um volume final de 10 µl misturaram-se de 1-6µl (30-90ng) do produto purificado da PCR, 4 µl da mistura de reação do *kit* Big Dye Terminator Cycle Kit ou 2 µl do *kit* Dyenamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit e 1µl (5 pmoles) de um dos iniciadores. A reação foi realizada em 35 ciclos das seguintes etapas: 90°C por 30 seg., 48°C por 60 seg. e 60°C por 6 min. em um termociclador MJ Research PTC-100 ou Techgene Ftgene2D.

Depois da reação de seqüenciamento, as amostras de DNA foram novamente purificadas utilizando-se a seguinte metodologia:

1. Acrescentou-se ao produto da reação de seqüenciamento: 1µl de acetato de amônio 7,5 M, 10µl de água ultra pura e 65 µl de etanol absoluto.
2. Homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos.
3. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 20 minutos.
4. Descartou-se o sobrenadante.
5. Lavaram-se as amostras com etanol 70%.
6. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 minutos.
7. Descartou-se o sobrenadante e as amostras foram secadas em dessecador a vácuo.

Com as amostras já purificadas, foi feita a leitura da seqüência de DNA,

utilizando-se seqüenciador automático e as análises dos eletroferogramas foram feitas com o programa BioEdit (HALL, 1999) ou Chromas 2.3 (Technelysium Pty Ltd).

4.2.4. Expressão gênica

4.2.4.1. Mutagênese sítio-dirigida para as mutações *K12R*, *G75R*, *V294M*, *G333C* e *R470W*

Nesse experimento foi utilizado o vetor pGS, que contém a região codificadora do gene *BCHE* (XIE et al., 1999; Figura 4). As trocas de nucleotídeos detectadas nas variantes *K12R*, *G75R*, *V294M*, *G333C* e *R470W* foram introduzidas no vetor através de mutagênese sítio-dirigida. Para isso foi utilizada a metodologia de PCR em duas etapas.

4.2.4.1.1. PCR em duas etapas (*two steps PCR*)

A. PCR

A primeira PCR contou com um iniciador mutagênico, contendo a substituição em questão, e um outro iniciador que hibridava no início ou no final do gene *BCHE*, dependendo da localização da mutação (Tabela 5). Essa PCR visava à produção de um fragmento, cujo tamanho variou de 200 a 412 pb entre as diferentes variantes, e que serviu como um mega iniciador para a segunda PCR.

As amplificações da primeira e da segunda PCRs foram realizadas em um volume total de 100 µL de reação, contendo 68 µL água, 10 µL tampão Pfu 10 X, 5 µL de iniciador "sense" (0,2 ng/ml), 5 µL de iniciador "antisense" (0,2 ng/ml), 10 µL dNTP, 1 µL Pfu, 1 µL pGS WT-BChE (100 ng/µL), 3 gotas de óleo mineral. As PCRs foram realizadas em termociclador Perkin Elmer Cetus e o ciclo de amplificação foi programado do seguinte modo:

1) 94°C por 1 min.; 2) 94°C por 30 segs.; 3) 55°C por 1 min.; 4) 68°C por 1 min. e meio; 5) repetir por 5 vezes do passo 2 ao 4; 6) 94°C por 30 segs.; 7) 55°C por 1 min.; 8) 68°C por 10 mins.

Após a PCR, a presença do produto amplificado foi verificada em gel de agarose 1% (0,5 g de agarose em 50 ml de tampão TA 1X - Trizma base 40 mM,

Tabela 5. Iniciadores utilizados nas PCRs para introdução das mutações no gene *BCHE*

Iniciadores	Nt ^a	Seqüência
Sem mutação		
T7 ^b	—	TAATACGACTCACTATAGGG 3' (sense)
IP32	519	GGCTCTTCAGTGGGTTCA 3' (sense)
SP6	1798	ATTTAGGTGACACATTAG 3' (antisense)
XbaI	750	ACTGGTTGCTCTAGAGAGAATGAGAC (sense)
Com mutação		
K12Ras	48	CATCCCTCTGACTCTTCCATTCTTTGT (antisense)
G75Ras	246	CCACATCTCTGATCCGTGGAAGCGTGGAAACTTTGATCT (antisense)
E90Ds	250	CCAAACACTGACCTCAGTGACGACTGTTTATATCTAAATGTATG (sense)
E90Das	293	CATACATTTAGATATAAACAGTCGTCAGTGGTTCAGTGGTGG (antisense)
I99Ms	264	CTCAGTGAAGATTGTTTATATCTAAATGTATGGATGCCAGCACCT (sense)
I99Mas	306	AGGTGCTGGCATCCATACATTTAGATATAAACAATCTTCACTGAG (antisense)
294as	899	GTGAGAAAATCACCATCCATGGTCGGACCAAAGTTTAC (antisense)
G333Cas	1013	CTGAAGCCAGGAGCACAATAGACTAA (antisense)
470s	1398	TCCATAGTGAAATGGTGGGCAAATTTT (sense)

^aNucleotídeo em que ocorre o início da hibridação dos iniciadores.

^bHidrida na extremidade 5' do vetor pGS.

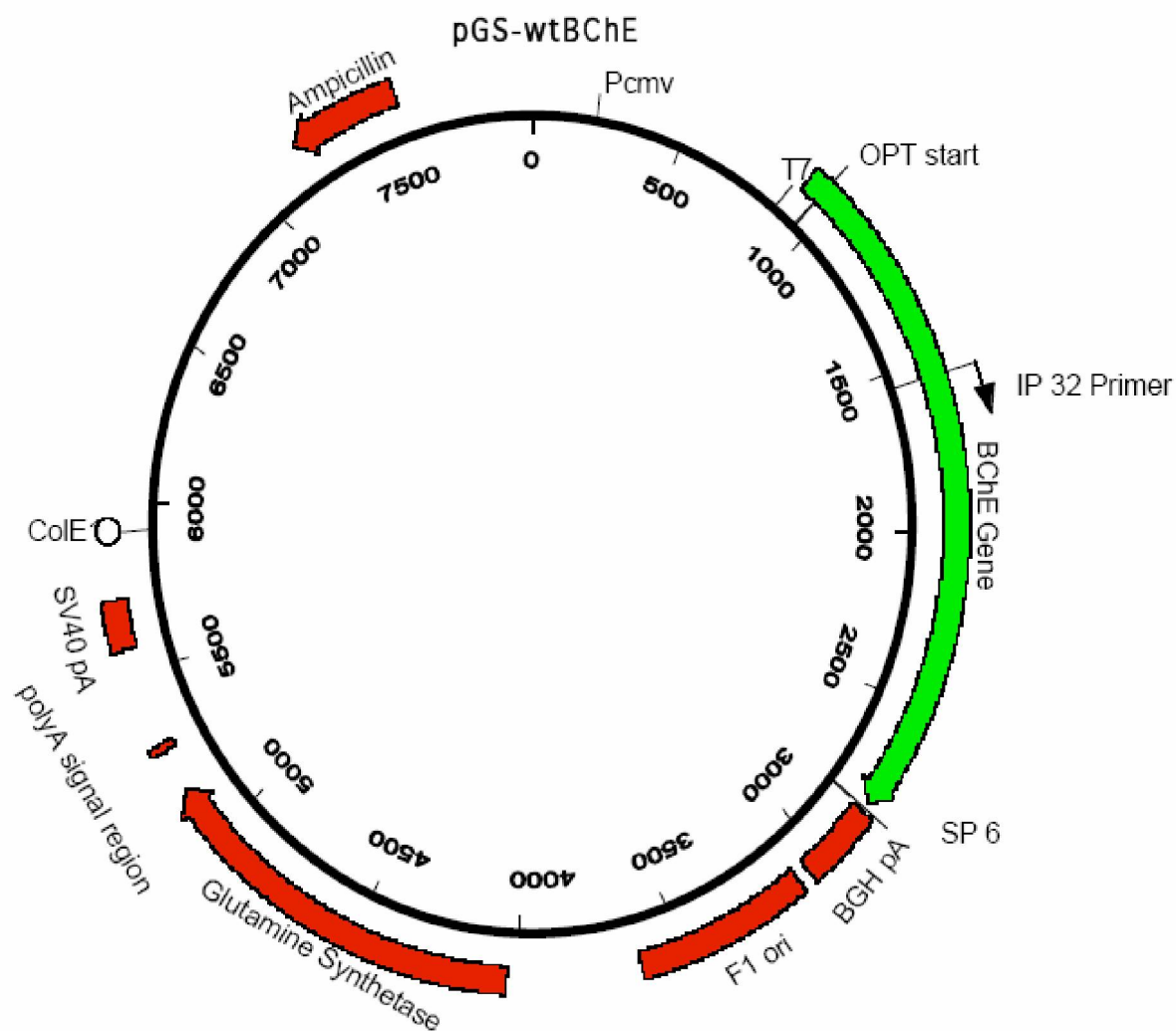


Figura 4. Gene *BCHE* (em verde) em vetor pGS. As localizações dos iniciadores, utilizados na mutagênese sítio-dirigida e no seqüenciamento, estão indicadas (SP 6, T7 e IP 32). As características do vetor estão indicadas em vermelho (gene de resistência à ampicilina, gene para glutamina sintetase, região do sinal de poliA, Pcmv – marcador resistente à neomicina de pRC, SV40 pA – sinal de terminação de transcrição e poliadenilação do RNAm de células que expressam antígeno SV40, ColEI – sinal para replicação de alto número de cópias e crescimento em *E. coli*, BGH pA – hormônio de crescimento bovino para terminação eficiente da transcrição e poliadenilação do RNAm, T1 ori – produção de DNA de fita simples).

EDTA Na₂H₂O 1 mM, ácido acético glacial 30 mM) com brometo de etídeo 3,2 µg/mL.

B. Purificação do produto amplificado

Os produtos das duas PCR foram purificados com o uso do kit QIAquick (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

4.2.4.1.2. Digestão do produto amplificado

Após a segunda PCR, o produto amplificado purificado, contendo o gene *BCHE* mutado (1018 pb), foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Apa*I (variantes *V294M*, *G333C* e *R470W*) e *Xba*I e *Hind*III (variante *K12R*). Foram usados dois tubos para cada variante, o primeiro contendo: 4 µL de tampão multi core (para *Xba*I e *Apa*I) ou react II (para *Xba*I e *Hind*III), 9 µL do produto amplificado, 1 µL de cada enzima de restrição e água para um volume final de 40 µL. O segundo tubo continha 3 µL de tampão multi core ou react II, 5 µL de DNA do vetor pGS WT que contém o inserto com o gene *BCHE* usual (100 ng/ml), 1 µL de cada enzima de restrição e água para um volume final de 30 µL. A digestão foi feita por 1 hora a 37°C.

4.2.4.1.3. Gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP = *low melting point*)

Após a digestão, o produto digerido dos tubos foi colocado em um gel de agarose LMP 1% (0,5 g de agarose LMP em 50 mL de tampão TAE 1X) com brometo de etídeo 3,2 µg/ml. A corrida foi de 1 hora a 100 volts para a separação das bandas do inserto e do vetor e para a posterior excisão das respectivas bandas. A banda contendo o vetor apresentava um tamanho de aproximadamente 6900 pb e a banda referente ao inserto um tamanho de 1018 pb (Figura 5).

4.2.4.1.4. Reação de ligação

Os fragmentos foram excisados do gel e foram colocados em banho-maria a 65°C para sua fusão. Em seguida, centrifugou-se o material para a separação do gel e do DNA. Em 3 tubos diferentes, colocaram-se 10 µL de solução de ligação (25 µL de

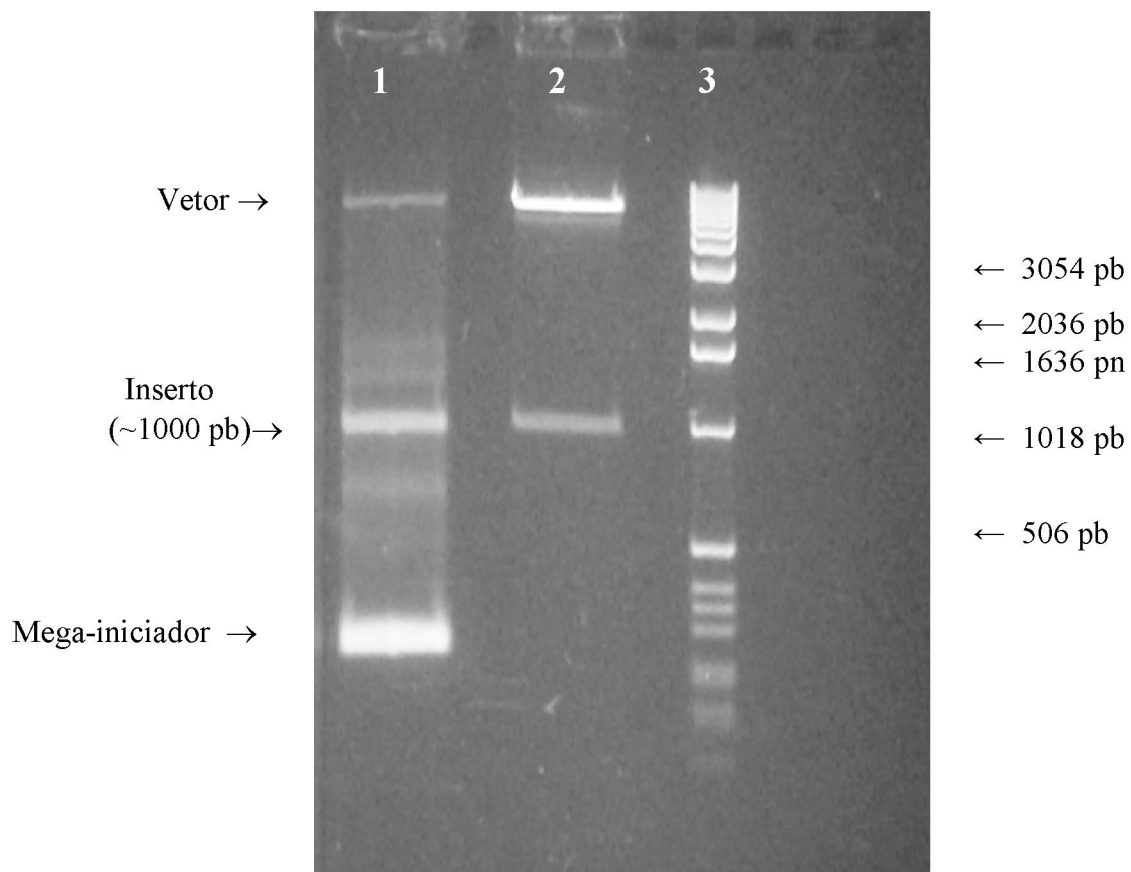


Figura 5. Gel de agarose (1% em tampão TAE 1X) de baixo ponto de fusão (LMP). 1) Vetor pGS, produto da 2^a PCR com a mutação induzida, após clivagem com a enzima de restrição apropriada e mega-iniciador; 2) Vetor pGS e o gene *BCHE* usual após clivagem com enzima de restrição; 3) Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen). As bandas referentes ao inserto (coluna 1) e ao vetor (coluna 2) foram excisadas e utilizadas na reação de ligação.

água, 20 µL de tampão da enzima T4 DNA ligase e 5 µL da enzima T4 DNA ligase) e diferentes volumes de DNA do inserto e do vetor: 5 µL de DNA inserto e 5 µL de DNA vetor de DNA inserto e 5 µL de DNA vetor (tubo 2) e 10 µL de DNA vetor (tubo 3; (tubo 1); 7 µL controle). As misturas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas para a reação de ligação e, então, utilizadas para a transformação em *E. coli* DH5α.

4.2.4.1.5. Transformação

Prepararam-se 5 placas de Petri contendo 25 mL de meio LB em ágar (triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%) contendo ampicilina (100 µg/mL). Os tubos provenientes das reações de ligação foram novamente submetidos a banho maria a 65°C pelo período necessário para fluidificar o gel. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL de células de *E. coli* DH5α competentes em cada tubo. Os tubos foram incubados por 1 hora no gelo e, após esse tempo, submetidos a choque térmico a 42°C por 45 segundos. Adicionaram-se 0,5 ml de meio SOC (triptona 2,0%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,01 M, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicose 0,02 M) e incubaram-se os tubos por 1 hora a 37°C. Os conteúdos dos tubos foram, então, semeados nas placas de Petri, que foram incubadas durante a noite a 37°C. Os conteúdos dos tubos contendo inserto e vetor, foram colocados em duas placas (100 µL e 400 µL), enquanto que o conteúdo do tubo com apenas o vetor foi colocado em uma placa (500 µL, controle). Esperava-se que não houvesse crescimento de bactérias nas placas controle. Após esse período, as colônias de bactérias, que cresceram no meio, isto é, aquelas com inserto e vetor, foram inoculadas em 3 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas durante a noite a 37°C em agitador Series 25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific). As culturas de bactérias foram então, utilizadas para extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (item 4.2.4.3)

4.2.4.2. Mutagênese sítio-dirigida para as mutações *E90D* e *I99M*

As substituições dos nucleotídeos desses alelos variantes não usuais foram introduzidas em vetor pGS utilizando o kit Mutagênese Sítio Dirigida QuikChange

(Stratagene), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Foram utilizados iniciadores mutagênicos (sense e antisense) para a introdução da mutação desejada no vetor, assim como para a eliminação de um sítio de restrição da enzima *BbsI*. A remoção do sítio de restrição da enzima *BbsI* permite o rastreamento de clones que apresentam a mutação introduzida, uma vez que os mesmos apresentam um padrão de bandas diferente do tipo usual, quando digeridos com a referida enzima de restrição.

4.2.4.2.1. Reação de PCR

As amplificações foram realizadas em um volume total de 50 μL de reação, contendo 30 μL de água, 5 μL de tampão 10X Pfu Turbo, 5 μL de iniciador “sense” (0,2 ng/mL), 5 μL de iniciador “antisense” (0,2 ng/mL), 2 μL de dNTPs 0,2 ng/mL, 1 μL de Pfu Turbo, 1 μL de pGS WT-BChE (100 ng/ μL), 3 gotas de óleo mineral. As PCRs foram realizadas em termociclador Perkin Elmer Cetus e o ciclo de amplificação foi o seguinte:

1) 95°C por 1 min.; 2) 95°C por 1 min.; 3) 55°C por 1 min.; 4) 68°C por 7 min.; 5) Repetir os passos 2 a 4 por 20 vezes; 6) 95°C por 1 min.; 7) 55°C por 1 min.; 8) 68°C por 15 mins.

Após a PCR, a presença do produto amplificado foi verificada em gel de agarose 1% (0,5 g de agarose em 50 mL de tampão TAE 1X com brometo de etídeo 3,2 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.4.2.2. Digestão do DNA parental por *DpnI*

A endonuclease *DpnI* é específica para DNA metilado e semi-metilado e é usada para digerir o DNA parental e selecionar o DNA sintetizado contendo a mutação. Adicionou-se 1 μL de *DpnI* diretamente aos tubos provenientes da PCR e incubou-se por 1 hora a 37°C.

4.2.4.2.3. Transformação

Prepararam-se as placas de Petri contendo 25 mL de meio LB em ágar com 0,1 g de ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$). Em um tubo colocaram-se 50 μL de células de *E coli*

DH5 α e 3 μ L da reação de PCR. Incubou-se a mistura no gelo por 1 hora. Em seguida, aplicou-se um choque térmico, colocando-se os tubos a 42°C por 30 segundos. Retornaram-se os tubos ao gelo, enquanto adicionavam-se 250 μ L de meio SOC em cada tubo e incubou-se por 1 hora a 37°C. Os conteúdos dos tubos foram, então, semeados nas placas de Petri e as placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Após esse período, escolheram-se algumas colônias que cresceram nas placas e inocularam-nas em 3 mL de meio LB com ampicilina. Foram incubadas durante a noite a 37°C em agitador.

4.2.4.3. Extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina

Colocaram-se 1,5 mL da cultura de bactérias em um tubo de 1,5 mL (o restante foi estocado a 4°C) e procedeu-se à lise alcalina, de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989):

- Centrifugou-se por 1 minuto a 14.000 rpm para a precipitação das bactérias.
- O sobrenadante foi descartado e secado o máximo possível, com inversão do tubo em papel toalha.
- O precipitado foi ressuspendido por agitação em vórtex em 100 μ L de uma solução gelada (50 mM de glucose; 10 mM de EDTA; 25 mM de Tris-Cl pH 8,0) e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente.
- Após esse tempo, adicionaram-se 200 μ L de uma solução de 0,2 N NaOH e 1% SDS. Os tubos foram fechados e o conteúdo foi misturado por inversão rápida dos tubos por 2 a 3 vezes. Incubou-se por 5 minutos no gelo.
- Adicionaram-se 150 μ L de uma solução gelada de acetato de potássio pH 4,8 (29,4 g de acetato de potássio, 11,5 ml de ácido acético glacial) e colocou-se no vórtex para agitação delicada em posição invertida por 10 segundos. Incubou-se no gelo por 5 minutos.
- As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo limpo.
- Adicionaram-se ao sobrenadante 400 μ L de fenol-clorofórmio e misturou-se por vórtex.

- Centrifugou-se por 2 minutos a 14.000 rpm.
- O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e adicionou-se 1 mL de etanol 95%. Misturou-se por vórtex e incubou-se por 2 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugou-se por 2 minutos a 14.000 rpm.
- O sobrenadante foi removido e secaram-se os tubos o máximo possível com inversão em papel toalha.
- Centrifugou-se novamente e com tubos capilares removeram-se os resquícios de etanol do tubo.
- Adicionaram-se 50 µL de TE pH 7,6 (20 mM de Tris; 0,1 mM EDTA pH 7,6).

4.2.4.4. Digestão para verificação da presença do inserto

Após a lise alcalina, o DNA das amostras obtidas por PCR em 2 etapas foi digerido com as mesmas enzimas usadas na digestão anterior (*XbaI/ApaI* e *XbaI/HindIII*) para verificar a presença do inserto, durante 1 hora a 37°C, e as amostras foram corridas em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. Já o DNA das variantes *E90D* e *I99M* foi digerido com a enzima de restrição *BbsI* para a verificação da presença da mutação (um sítio de restrição da enzima próximo às mutações foi retirado nas duas variantes).

4.2.4.5. Amplificação do DNA plasmidial

Escolheu-se uma amostra de bactérias que tinham sido estocadas em meio de cultura a 4°C e que tinham quantidade relativamente alta do inserto ou que apresentavam padrão de bandas compatível com a presença da mutação (variantes *E90D* e *I99M*), e inocularam-se 200 µL dessa amostra em 1 litro de meio LB com 0,1 g de ampicilina (100 µg/ml). Incubou-se durante a noite a 37°C sob vigorosa agitação (~ 300 rpm).

4.2.4.6. Purificação do DNA plasmidial

Para a purificação do DNA plasmidial, utilizou-se o *kit* Qiagen Plasmid Mega (Qiagen), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante:

- O meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos a 4°C em 6000 rpm. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuscitado em 50 mL de tampão P1 (Tris-Cl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; 100 µg/mL de RNase A).
- Adicionaram-se à solução 50 mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%), misturou-se gentilmente por inversão do tubo por 4-6 vezes. Incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente.
- Adicionaram-se 50 mL de tampão P3 (acetato de potássio pH 5,5 3 M) gelado, misturou-se gentilmente por inversão do tubo por 4-6 vezes e incubou-se no gelo por 30 minutos.
- Centrifugou-se em 13000 rpm a 4°C, durante 30 minutos. Removeu-se o sobrenadante e o mesmo foi filtrado em lenço de papel.
- Preparou-se a coluna Qiagen Tip 2500, adicionando-se 35 mL de tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; isopropanol 15%; Triton X-100 15%). Deixou-se a coluna esvaziar-se por fluxo gravitacional.
- Adicionou-se um volume da solução de DNA que completasse a coluna e deixou-se o DNA entrar na resina por fluxo gravitacional.
- Lavou-se duas vezes com 35 mL de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM, pH 7,0; isopropanol 15%).
- Eluiu-se o DNA da resina com 15 mL de tampão QF (NaCl 1,25 M; Tris-Cl 50 mM, pH 8,5; isopropanol 15%).
- Os passos foram repetidos até que todo DNA fosse eluído da coluna.
- O DNA foi precipitado adicionando-se 0,7 volumes de isopropanol em temperatura ambiente. Misturou-se por inversão do tubo e centrifugou-se em 3500 rpm a 4°C, durante 30 minutos.
- O sobrenadante foi descartado por sucção, com um sugador a vácuo, e eliminou-se o máximo possível qualquer resquício de isopropanol do tubo.
- Adicionaram-se 7 mL de etanol 70% ao precipitado de DNA, à temperatura ambiente e centrifugou-se a 3500 rpm, a 4°C durante 20 minutos.
- Descartou-se o sobrenadante por sucção a vácuo, eliminando o máximo possível qualquer resquício de etanol do tubo. Adicionou-se 1 mL de tampão TE (Tris-Cl 5

mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM).

- O volume de DNA foi separado em tubos de 1,5 mL. Um tubo foi mantido estéril para a transfecção e o outro foi utilizado na dosagem de DNA e para a reação de seqüenciamento.

4.2.4.7. Dosagem do DNA

A dosagem do DNA foi realizada em fluorímetro TKO 100 (Hoefer). Utilizou-se tampão e fluoróforo indicados pelo fabricante do aparelho. O princípio do método é a ligação do fluoróforo ao DNA.

4.2.4.8. Seqüenciamento do gene *BCHE* contendo as mutações

A reação de seqüenciamento foi realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Eppley, do Centro Médico da Universidade do Nebraska (UNMC). Foram utilizados três iniciadores diferentes: T7, IP 32 e SP 6 (Tabela 5), que permitem o seqüenciamento completo da região do gene *BCHE*, contida no vetor pGS. Toda a região do gene *BCHE* foi analisada, a fim de assegurar a ausência de mutações indesejadas. O número de clones analisados para cada amostra variou de 5 a 10. Todas as amostras tiveram suas duas fitas analisadas.

4.2.4.9. Transfecção

Para a transfecção dos vetores, contendo os fragmentos mutados, foram utilizadas células que não expressam BChE endogenamente, uma vez que se pretende medir a atividade das enzimas variantes no meio de cultura, onde costumam ser secretadas. Todos os vetores com as variantes foram transfectados em duplicata.

4.2.4.9.1. Transfecção em células 293T

Todas as 7 mutações novas não sinônimas foram expressas por transfecção transitória em células 293T (células de epitélio renal humano que expressam BChE por um determinado período de tempo), em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Cellgro) com 10% de soro fetal bovino. Foram colocados 2 mL de células em meio de cultura, em cada poço de uma placa com 6 poços, e deixou-se por algumas

horas, para que as células se fixassem na placa. A transfecção seguiu o seguinte protocolo:

- Em um tubo de 15 mL colocaram-se 20 µL de CaCl₂, um volume de DNA plasmidial purificado contendo 8 µg de DNA e água para um volume final de 200 µL.
- Centrifugou-se por alguns instantes.
- Adicionaram-se 200 µL de Hepes 2x pH 7,05 à solução de DNA. Agitou-se em vórtex por 15 segundos.
- A solução ficou em repouso a temperatura ambiente, por 20 minutos.
- Após 20 minutos, agitou-se novamente no vórtex e adicionaram-se, gentilmente, 200 µL da suspensão de DNA em cada poço da placa contendo as células.
- Deixou-se incubando por 6 dias a 37°C, em incubadora com temperatura, umidade e concentração de CO₂ controlados (NAPCO 6300).

4.2.4.9.2. Transfecção em células de ovário de hamster chinês (CHO)

Apenas as mutações *V294M* e *R470W* não foram expressas nesse tipo de célula porque só foram confirmadas como mutações novas mais tarde que as demais. Para a transfecção permanente, foram utilizadas células CHO que, após serem transfectadas com o DNA plasmidial, expressam continuamente a enzima variante. Colocaram-se, em uma placa de Petri, 9 mL de meio Ham's F-12 1X (Cellgro) com 10% de soro fetal bovino e esperaram-se algumas horas para que as células se fixassem. Após esse período, procedeu-se a transfecção dos vetores em células CHO, com base no mesmo protocolo das células 293T (item 4.2.4.9.1).

De 4-6 horas após a transfecção, retirou-se o meio com a solução de DNA e substituiu-se por meio Ultra Culture com 50 µM de metionina sulfoximina (MSX), que elimina células sem plasmídeo. Seguiu-se o seguinte procedimento:

- Incubou-se a 37°C, em incubadora com umidade e CO₂ controlados, até que colônias de células aparecessem e crescessem o suficiente para serem transferidas.
- As colônias de células foram coletadas, com o auxílio de um cotonete, e colocadas em uma placa de 24 poços, contendo 1 mL de meio Ultra Culture (Cambrex) com 25 µM de MSX e incubadas a 37°C, até que as células se apresentassem com alto nível de

confluência, para serem removidas para um frasco maior.

- O meio de cultura, em que as células se encontravam, foi coletado para a posterior medida de atividade enzimática das células.
- As células foram então lavadas, com tampão PBS 1X, e tratadas com tripsina para que se desprendessem da parede da placa.
- Após o tratamento com tripsina, adicionou-se meio de cultura Ham's F-12 suficiente para coletá-las e colocou-se em um frasco com 5 mL do mesmo meio de cultura.
- Deixou-se durante a noite a 37°C para que as células de fixassem à parede do frasco. Após esse período, trocou-se o meio por meio Ultra Culture com 25 µM MSX.
- As células foram então deixadas em incubadora a 37°C e tiveram seu meio coletado e substituído por novo meio.

4.2.4.10. Atividade da BChE variante

A hidrólise da butiriltiocolina pela BChE variante foi medida por meio do método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) em 0,1M de tampão fosfato de potássio pH 7,0 a 25°C, em um comprimento de onda de 412 nm. Em uma proveta, colocou-se 1 ml de uma solução (tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, DTNB 20 mM, butiriltiocolina 0,1 M) e 10 µL de meio de cultura no qual a BChE foi secretada. A atividade da BChE foi expressa em unidades/mL.

4.2.4.11. Determinação do K_m para butiriltiocolina (BTC)

A hidrólise de BTC, catalisada pela BChE, foi medida como descrito no item 4.2.4.10. A concentração de BTC variou de 0,008 mM a 25 mM, conforme mostra a Tabela 6. Os valores de K_m , V_{max} , K_{ss} e b foram calculados por adequação da equação de velocidade de reação, em uma planilha feita em Excel (Anexo I), por Stacy Wieseler, do Instituto Eppley, do Centro Médico da Universidade de Nebraska, de acordo com RADIC et al. (1993), que considera o fato da BChE ser uma enzima alostérica:

$$v = \left(\frac{1 + b[S]/K_{ss}}{1 + [S]/K_{ss}} \right) \left(\frac{V_{max}}{1 + K_m/[S]} \right)$$

Tabela 6. Concentrações do substrato de butiriltiocolina ([S]) e volumes dos reagentes, utilizados no ensaio para cálculo dos parâmetros bioquímicos.

[S]	25 mM	10 mM	5 mM	2,5 mM	1 mM	0,5 mM	0,4 mM	0,2 mM
0,2 M tampão (µl)	125	50						
0,1 M tampão (µl)	750	900	975	975	975	975	975	975
DTNB (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25
0,2 M BTC (µl)	125	50	25	12,5	5	2,5	2	1
Meio de cultura (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10

[S]	0,4 mM	0,2 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,04 mM	0,03 mM	0,02 mM
0,1 M tampão (µl)	975	975	975	975	975	975	975
DTNB (µl)	25	25	25	25	25	25	25
0,02 M BTC (µl)	20	10	5	2,5	2	1,5	1
Meio de cultura (µl)	10	10	10	10	10	10	10

[S]	0,03 mM	0,02 mM	0,016 mM	0,014 mM	0,012 mM	0,010 mM	0,008 mM
0,1 M tampão (µl)	975	975	975	975	975	975	975
DTNB (µl)	25	25	25	25	25	25	25
0,002 M BTC (µl)	15	10	8	7	6	5	4
Meio de cultura (µl)	10	10	10	10	10	10	10

Onde

b: eficiência de hidrólise do complexo ternário SES (substrato-enzima-substrato) em relação ao complexo ES (enzima-substrato).

[S]: concentração de substrato

K_{ss} : constante de dissociação dos complexos ES e SES.

V_{max} : velocidade máxima de conversão de substrato em produto atingida por uma dada enzima.

K_m : concentração de substrato na qual uma reação catalisada por enzima ocorre à metade da V_{max} .

4.2.4.12. Titulação com clorpirifos-oxon (CPO)

Primeiramente, foram realizadas diversas medidas de absorbância, com diferentes tempos de incubação da enzima, na presença de 3 diferentes concentrações de CPO (0,21 nM, 0,12 nM e 0,05 nM). Essas medidas foram realizadas a fim de se estabelecer o tempo necessário de incubação para a inibição da BChE.

Após o estabelecimento do tempo de incubação, necessário para que o CPO inibisse a enzima, foi realizada a titulação com concentrações de CPO, que variaram de 0,025 nM a 0,50 nM, a 25°C, por um tempo que variou de 45 a 60 minutos. A hidrólise da butiriltiocolina, catalisada pela BChE, foi medida pelo método de Ellman (ELLMAN et al., 1961). As concentrações de CPO, utilizadas nos ensaios, assim como os volumes de cada reagente utilizado, estão sumarizados na Tabela 7. Os valores de absorbância obtidos através da inibição com CPO foram plotados em um gráfico ($\Delta A_{412nm} \times [CPO]$), a partir do qual pode-se calcular a concentração de CPO necessária para inibir a enzima: o ponto final indica atividade zero da enzima.

Para o cálculo de k_{cat} é necessário conhecer a concentração da enzima e o valor de V_{max} . V_{max} foi obtido a partir do experimento para cálculo de K_m . A concentração da

Tabela 7. Protocolo de titulação das enzimas usual e variantes não usuais, com os reagentes utilizados e respectivos volumes.

Amostra	0,1 M	BChE	CPO	[CPO]	Incubação		DTNB	BTC
	tampão (μ l)	(μ l)	(μ l)	nM	Início Δ min	Fim	(μ l)	(μ l)
1	960	10	0				25	5
2	960	10	0				25	5
3	960	10	0				25	5
4	960	10	0				25	5
5	955	10	5	0,025			25	5
6	950	10	10	0,05			25	5
7	945	10	15	0,075			25	5
8	940	10	20	0,10			25	5
9	935	10	25	0,125			25	5
10	930	10	30	0,15			25	5
11	925	10	35	0,175			25	5
12	920	10	40	0,20			25	5
13	910	10	50	0,25			25	5
14	900	10	60	0,30			25	5
15	890	10	70	0,35			25	5
16	880	10	80	0,40			25	5
17	860	10	100	0,50			25	5

enzima variante foi obtida a partir dos valores dos pontos finais referentes à enzima usual e à enzima variante e da concentração da BChE usual em moles/L, conforme:

$$[BChE_{\text{var iante}}] = [BChE_{\text{usual}}] \times \frac{\text{pontofinal}_{\text{var iante}}}{\text{pontofinal}_{\text{usual}}}$$

Para a obtenção da concentração da enzima usual, em moles/L, partiu-se de valores já conhecidos, obtidos pela Dra. Oksana Lockridge (dados não publicados, referentes à enzima usual: 720 unidades/mL correspondem a 85000 g/mole) e do valor de sua atividade enzimática em U/mL obtido no experimento.

Por fim, calculou-se o valor de k_{cat} em min^{-1} :

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[BChE]}$$

k_{cat} é uma constante de velocidade, também chamada de número de renovação. É equivalente ao número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula da enzima em uma dada unidade de tempo, quando a enzima está saturada com o substrato (LEHNINGER et al., 1995).

k_{cat} por minuto é igual a unidade de BChE por μmoles . Desde que $1\mu\text{mol}$ de BChE corresponde a 85 mg, $k_{\text{cat}}/85$ é igual a unidades de BChE/mg.

Um valor baixo de k_{cat} de um mutante, em comparação com o da enzima usual, significa que o mutante tem baixa atividade por mg de BChE.

4.2.4.13. *Western blot* para a variante sem atividade

Foi feito *Western blot* para a variante que condiciona enzima sem atividade (E90D) para verificar se a proteína estava sendo sintetizada. A presença da enzima foi investigada no meio de cultura (puro e concentrado 100 vezes) das células 293T transfectadas e no lisado das células CHO.

4.2.4.13.1. Gel de poliacrilamida em gradiente 4-30%

As placas de vidro foram montadas com espaçadores de 0,75 mm de espessura. Preparou-se um gel selante (1ml de 30% acrilamida, 10 µl de 10% persulfato de amônio e 2,5 µL de TEMED) e aplicou-se na base das placas. Para o preparo do gel em gradiente, o seguinte protocolo foi seguido:

- Prepararam-se as pré-misturas dos dois géis: um a 4% - 1 mL de acrilamida: bis (40:1) 40%, 2,5 mL de Tris Cl pH 8,9 1,5 M; 25 µL de persulfato de amônio 10%, 2,5 µL de TEMED e água para 10 mL; outro a 30% - 7,5 mL de acrilamida: bis (40:1) 40%, 2,5 mL de Tris Cl pH 8,9 1,5 M, 25 µL de persulfato de amônio 10% e 2,5 µL de TEMED.
- Colocaram-se 6 mL de cada pré-mistura em dois compartimentos separados de um aparelho gerador de gradiente e a mistura dos géis foi vertida automaticamente para as placas.
- Cobriu-se o gel com água e incubou-se em estufa a 37°C para a polimerização.
- Após a polimerização, descartou-se a água e secou-se, o máximo possível, o espaço entre as placas.
- Preparou-se o gel de empilhamento a 4%: 0,5 ml de acrilamida: bis (40:1) 40%, 1,25 mL de Tris Cl pH 6,8 0,5 M, 25 µL de persulfato de amônio 10%, 5 µL de TEMED e água para 5 mL.
- Com o auxílio de pipeta Pasteur, colocou-se o gel no aparato eletroforético e inseriu-se o pente. Deixou-se polimerizar em temperatura ambiente.

4.2.4.13.2. Preparo das amostras

O *Western blot* para verificar a expressão da variante *E90D* foi realizado utilizando-se meio de cultura no qual cresceram as células 293T com o vetor contendo a variante. Utilizou-se um volume máximo de 25 µL para os dois tipos e 5 µL de Tris pH 7,4 0,1 M com 50% de glicerol e azul de bromofenol.

Para o *Western blot* com as células CHO, o protocolo utilizado foi o seguinte:

As células CHO, contendo a mutação *E90D* ou a mutação *G75R* (controle positivo) e células CHO sem o vetor (controle negativo) foram lavadas com solução salina fosfato tamponada (PBS) e adicionou-se tripsina aos frascos para que as células

se desgrudassem das paredes. As células foram novamente lavadas com PBS e centrifugadas a 14000 rpm para a eliminação do sobrenadante contendo a solução. As células foram ressuspensas em um determinado volume de água e acrescentou-se o mesmo volume de 0,1 M Tris pH 7,4 com 50% de glicerol e azul de bromofenol.

Os lisados de células foram então colocados no gel, com volumes correspondentes a 25 µg, 50 µg e 100 µg de proteína (*E90D*) e 25 µg e 50 µg para os controles positivo e negativo, respectivamente.

4.2.4.13.3. Corrida eletroforética

O gel (16 x 18 x 0,075 cm) foi corrido a 250 V por 20 horas, a 4°C. Dois tipos diferentes de tampões foram utilizados na cuba eletroforética: tampão superior (Tris pH 8,3 0,25 M; glicina 1,92 M) e tampão inferior (Tris HCl 2 M, pH 8,1).

4.2.4.13.4. Transferência para a membrana

Foi utilizada a membrana PVDF (Bio-Rad) para a transferência da proteína. O seguinte protocolo foi seguido:

- Preparou-se o tampão de transferência: Tris base 25 mM, glicina 192 mM.
- Prepararam-se os materiais para o sanduíche: 4 folhas de papel filtro Whatman um pouco maiores que o gel a ser transferido e 2 pedaços de feltro, ambos molhados em tampão de transferência.
- Cortou-se a membrana no mesmo tamanho do gel e marcou-se uma extremidade para orientação. A membrana foi então molhada em metanol e transferida para uma cuba com água, onde foi submergida várias vezes. O mesmo processo foi repetido em uma cuba, contendo tampão de transferência.
- O gel foi removido do aparato eletroforético, as partes desnecessárias foram cortadas e a base inferior direita foi marcada para orientação. Colocou-se o gel em cuba, contendo tampão de transferência para a lavagem.

- Procedeu-se, então, à montagem do sanduíche: uma prensa, 1 pedaço de feltro embebido em tampão, 2 pedaços de papel filtro, gel, membrana, 2 pedaços de papel filtro, 1 pedaço de feltro. Removeram-se todas as bolhas e o sanduíche foi fechado
- A transferência eletroforética foi feita em um aparelho apropriado, por 1 hora a 70 volts e 0,50 amperes.

4.2.4.13.5. Bloqueio e hidratação com anticorpo monoclonal anti-BChE

Com o uso de uma pinça, transferiu-se a membrana para uma cuba contendo tampão de bloqueio: Tris HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, 0,2% de Tween 20 (Biotech) e 5% de leite em pó (Carnation Natural Nonfat Dry Milk). Incubou-se por 3-4 horas em agitador a 37° C. Após esse tempo, a membrana foi colocada em um saco de plástico com 6 mL de tampão de bloqueio e 4 mL de anticorpo monoclonal contra a BChE (C 191 2.2-1), produzido pela Dra. Oksana Lockridge, e incubada durante a noite a 4°C.

4.2.4.13.6. Revelação da membrana e hibridação com o anticorpo anti-IgG conjugado à peroxidase

Para a lavagem da membrana os seguintes passos foram seguidos:

- Lavou-se a membrana duas vezes em uma solução de TBS (Tris HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM).
- Incubou-se por 5 minutos em uma solução de TBS com 0,2% de Tween 20 e 5% de leite em pó.
- Incubou-se por 5 minutos em uma solução de TBS com 3% de Tween 20 e 5% de leite em pó.
- Incubou-se por 5 minutos em uma solução de TBS.
- Incubou-se por 5 minutos em uma solução de TBS com 0,2% de Tween 20.
- Incubou-se 2 vezes, por 5 minutos, em uma solução de TBS com 0,2% de TBS com 0,2% de Tween 20 e 5% de leite em pó.
- Em seguida, reibridou-se a membrana com 10 µL do segundo anticorpo (IgG conjugada à peroxidase) e 10 mL de TBS com 0,2% de Tween 20 e 5% de leite em pó. Incubou-se durante a noite a 4° C.
- Após esse período, lavou-se a membrana 2 vezes em TBS.
- Incubou-se por 5 minutos em TBS, 0,2% Tween 20 e 5% de leite em pó.

- Incubou-se por 5 minutos em TBS, 3% Tween 20 e 5% de leite em pó.
- Incubou-se por 5 minutos em TBS.
- Incubou-se 5 minutos em TBS com 0,2% Tween.
- Incubou-se 2 vezes em TBS com 5% de leite em pó.
- A membrana foi molhada em uma solução contendo 3 mL de substrato A e 3 mL de substrato B (LumiGLO Chemiluminescent Substrate *Kit* 2-C – KPL) e colocada em cassete. Em seguida, colocou-se um filme (Kodak Científico) sobre a membrana e deixou-se por um tempo, que variou de 2 a 60 minutos.
- O filme foi então colocado em processador Kodak M35A X-Omat para a revelação. Os processos de exposição e revelação foram realizados no escuro.

4.2.4.14. Estrutura terciária da butirilcolinesterase

A estrutura terciária das enzimas variantes não usuais foi obtida por meio do programa Sbyl 6.91 (Trypos), no qual se introduz a informação sobre a troca dos aminoácidos da BChE usual pelos aminoácidos das BChEs variantes não usuais.

4.2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa STATISTICA for Windows (STATSOFT, Inc., 1996). Foram utilizados os testes χ^2 , t, e F. Para valores de χ^2 com um grau de liberdade, quando o valor da frequência esperada era menor que 5, utilizou-se a correção de Yates. Foi realizada análise de regressão múltipla escalonada tendo como variável dependente a atividade enzimática e como variáveis independentes: tempo de estocagem, idade e IMC.

Foi utilizado o programa Arlequin (SCHNEIDER et al., 2000) para estimar frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção das amostras

5.1.1. Fenotipagem do loco *CHE2*

A Tabela 8 mostra as frequências dos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5– encontradas no presente trabalho. Essa fenotipagem permitiu a exclusão de 75 indivíduos de fenótipo CHE2 C5+, de modo que a atividade da BChE foi examinada em 570 doadores de sangue.

5.1.2. Atividade da BChE (KU/L)

A atividade média da BChE nos doadores de sangue de fenótipo CHE2 C5– foi de $4,62 \pm 0,04$ KU/L. Considerando-se esses 570 indivíduos, verificou-se que houve correlações significativas entre a atividade da BChE e as variáveis idade e tempo de estocagem em meses (Tabela 9). A distribuição da atividade da BChE dos 570 doadores de sangue está mostrada na figura 6.

A escolha das três classes de atividade (baixa, média e alta) foi baseada nos valores da mediana, do quartil inferior e do quartil superior que foram, respectivamente: 4,65 KU/L, 4,09 KU/L e 5,25 KU/L. Para conseguir um número semelhante de amostras nos três grupos, optou-se por tomar 0,25 de cada lado da mediana para compor o grupo de atividade média. Estabeleceu-se uma diferença de 0,65 da mediana para os limites dos quartis. Dessa forma, foram considerados pertencentes aos grupos de atividade baixa, média e alta os indivíduos que apresentavam, respectivamente, atividade $\leq 4,0$ KU/L, $4,4 \text{ KU/L} \leq \text{atividade} \leq 4,9$ KU/L, e atividade $\geq 5,3$ KU/L. A exclusão das amostras com atividade entre 4,0 e 4,4 e entre 4,9 e 5,3 possibilitou uma melhor separação entre os grupos. Os grupos de atividade baixa, média e alta foram constituídos de 132, 130 e 130 indivíduos, respectivamente, perfazendo um total de 392 doadores de sangue. A Tabela 10 mostra as atividades médias dos três grupos de atividade estudados.

Tabela 8. Frequências dos fenótipos do loco *CHE2*.

Fenótipo	N ¹	% ± E.P.
CHE2 C5+	75	11,63 ± 1,30
CHE2 C5–	570	88,37 ± 1,30
Total	645	

¹Número de indivíduos

Tabela 9. Coeficientes de correlação (r) entre a atividade da BChE e as variáveis tempo de estocagem, idade e IMC em 570 indivíduos de fenótipo CHE2 C5–.

	Tempo de estocagem	Idade	IMC
r	-0,18	0,09	0,07
p	< 0,001	< 0,05	> 0,05

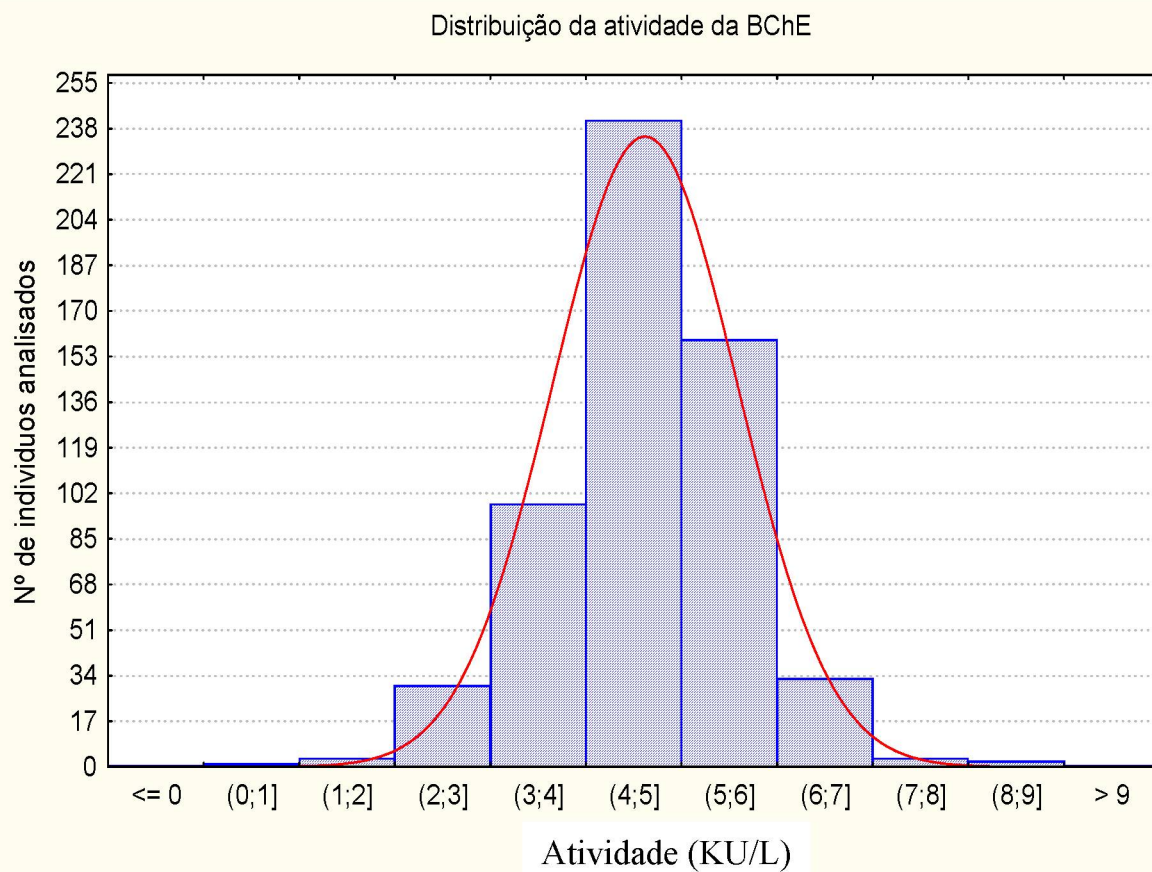


Figura 6. Distribuição da atividade da BChE em 570 doadores de sangue masculinos, euro-brasileiros e de fenótipo CHE2 C5-.

Verificou-se que houve diferença significativa no tempo médio de estocagem entre os grupos de atividade baixa e média e entre os grupos de atividade baixa e alta (Tabela 11). Quando, porém, compararam-se os grupos de atividade média e alta, o valor de t não foi significativo (Tabela 11). As amplitudes de variação no tempo de estocagem, em meses, nos grupos de atividade baixa, média e alta foram, respectivamente: 49 a 79; 48 a 79 e 48 a 79. A análise de variância do tempo de estocagem entre os três grupos de atividade analisados mostrou um valor de $F = 9,97$, ($P < 10^{-4}$).

Quando as variáveis tempo de estocagem, idade e IMC foram consideradas como independentes em regressão múltipla escalonada, na qual a atividade foi a variável dependente, observou-se que a idade (Tabela 9) deixou de mostrar correlação significativa (Tabela 12). Quanto ao tempo de estocagem, verificou-se uma tendência das amostras com maior tempo de estocagem apresentarem, em média, menores valores de atividade enzimática ($P < 0,0001$) e observou-se que quando apenas essa variável é considerada na regressão, o valor de r^2 passa a ser de apenas 3%.

5.1.3. Amplificação das amostras

Os grupos de atividade enzimática baixa, média e alta, escolhidos para serem examinados quanto ao DNA, foram compostos por 120, 126 e 124 indivíduos, respectivamente. Na análise do DNA, houve 22 casos em que a amplificação não foi possível devido à falta de DNA ou outros problemas com o DNA.

Em relação à porcentagem de amplificação dos fragmentos do exon 2, verificou-se que o valor variou entre $96,8\% \pm 0,65\%$ e $98,9\% \pm 0,38\%$ (Tabela 13). Quando a porcentagem de amplificação foi analisada para o exon 4, observou-se um valor de $98,9\% \pm 0,38\%$.

Tabela 10. Média de atividade da BChE nos três grupos de atividade enzimática.

Grupo de atividade	N ¹	M ± E.P.	t (P) ²
Baixa	132	3,33 ± 0,05	25,06 (≅ 0,0)
Média	130	4,65 ± 0,01	
Alta	130	5,83 ± 0,05	
Total	392	4,60 ± 0,06	

¹ Número de indivíduos selecionados pela atividade enzimática

² Atividade baixa X alta: t = 36,59 (P ≅ 0,0)

Tabela 11. Tempo médio de estocagem, em meses, nos três grupos de atividade enzimática.

Grupo de atividade	N ¹	M ± E.P.	t(P) ²
Baixa	131	66,54 ± 0,86	3,62 (p < 10 ⁻³)
Média	130	61,85 ± 0,97	
Alta	129	61,40 ± 0,88	0,34 (p = 0,73)
Total	390		

¹ N = número de indivíduos selecionados pela atividade enzimática. O tempo de estocagem das amostras não foi registrado para dois casos.

² Atividade baixa X alta: t = 4,18 (P < 10⁻⁴).

Tabela 12. Resultados da análise de regressão múltipla escalonada, referentes à amostra de indivíduos de fenótipo CHE2 C5–, pertencentes aos três grupos de atividade da BChE (N = 390¹), considerando-se a atividade como variável dependente (Y)

$\overline{Y} \pm DP = 4,60 \pm 1,12$ $a \pm EP = 3,78 \pm 1,08$				
Variáveis independentes	M \pm DP	b \pm EP	t	P
Tempo de estocagem	63,27 \pm 10,55	–0,02 \pm 0,005	3,94	< 10 ^{–4}
Idade	22,65 \pm 3,12	0,03 \pm 0,018	1,76	0,08
IMC	22,75 \pm 1,30	0,06 \pm 0,043	1,46	0,14

Análise de Variância				
Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	F	r ²
Regressão	3	27,02	7,49	0,055
Resíduo	386	463,96	p < 10 ^{–4}	
Total	389	490,98		

¹ Dos 392 indivíduos selecionados a partir da curva da atividade, faltou o dado de tempo de estocagem da amostra em dois casos.

Tabela 13. Porcentagem de amplificação de cada fragmento analisado no exon 2.

Fragmento	N ¹	Amplificação (% \pm %E.P.)
Nt -42 a 204	366	98,9 \pm 0,38
Nt 155 a 347	361	97,6 \pm 0,57
Nt 304 a 535	366	98,9 \pm 0,38
Nt 481 a 719	358	96,8 \pm 0,65
Nt 659 a 876	358	96,8 \pm 0,65
Nt 835 a 1059	361	97,6 \pm 0,57
Nt 1000 a 1235	361	97,6 \pm 0,57
Nt 1194 a 29 (intron 2)	358	96,8 \pm 0,65
Total		97,6 \pm 0,57

¹N = Total de indivíduos analisados

5.2. Variabilidade genética

Foram examinados os exons 2 e 4 do gene *BCHE*, sendo que o exon 2 foi analisado em 8 segmentos (Apêndice 2).

5.2.1. Exon 2

5.2.1.1. Nucleotídeos –42 a 204

Nesse fragmento foram encontradas duas variantes não usuais (uma no grupo de atividade baixa e outra no grupo de atividade média), conforme mostrado na Tabela 14 e na Figura 7. Essas variantes apresentaram atividade enzimática de 3,98 KU/L e 4,78 KU/L, respectivamente nos plasmas de indivíduos portadores.

O seqüenciamento de DNA da amostra variante encontrada no grupo de atividade baixa mostrou uma alteração no nucleotídeo 35 (doador 1288), ainda não descrita na literatura, cuja mudança do códon AAA para AGA leva a uma substituição de aminoácidos (Lys → Arg), constituindo a mutação *K12R*. A outra mutação, também ainda não descrita, encontrada no doador 442, é uma alteração no nucleotídeo 45 (G → C), não levando à alteração de aminoácido (mutação *G15G*). A frequência de cada um desses alelos variantes na amostra total (N = 732) foi de $0,14\% \pm 0,13\%$.

5.2.1.2. Nucleotídeos 155 a 347

Esse fragmento apresentou apenas a mutação *D70G*, atípica, (13 doadores: 125, 143, 467, 722, 987, 1137, 1243, 1262, 1263, 1594, 1847, 1943 e 2216).

A frequência da mutação *D70G* na amostra total é de $1,80\% \pm 0,49\%$ (Tabela 15 e Figura 8). Quando a atividade enzimática dessas variantes no plasma foi analisada, verificou-se uma atividade média em KU/L de $3,04 \pm 0,21$, com os valores variando entre 1,90 KU/L e 4,83 KU/L.

Tabela 14. Frequências de variações encontradas no segmento entre os nucleotídeos –42 e 204, de acordo com o grupo de atividade enzimática.

Atividade	Alelos	<i>K12R</i>		<i>G15G</i>	
		N ¹	% ± EP	N ¹	% ± EP
Baixa	236	1	0,42 ± 0,42	0	—
Média	250	0	—	1	0,40 ± 0,40
Alta	246	0	—	0	—
Total	732	1	0,14 ± 0,13	1	0,14 ± 0,13

¹N = número de alelos não usuais.

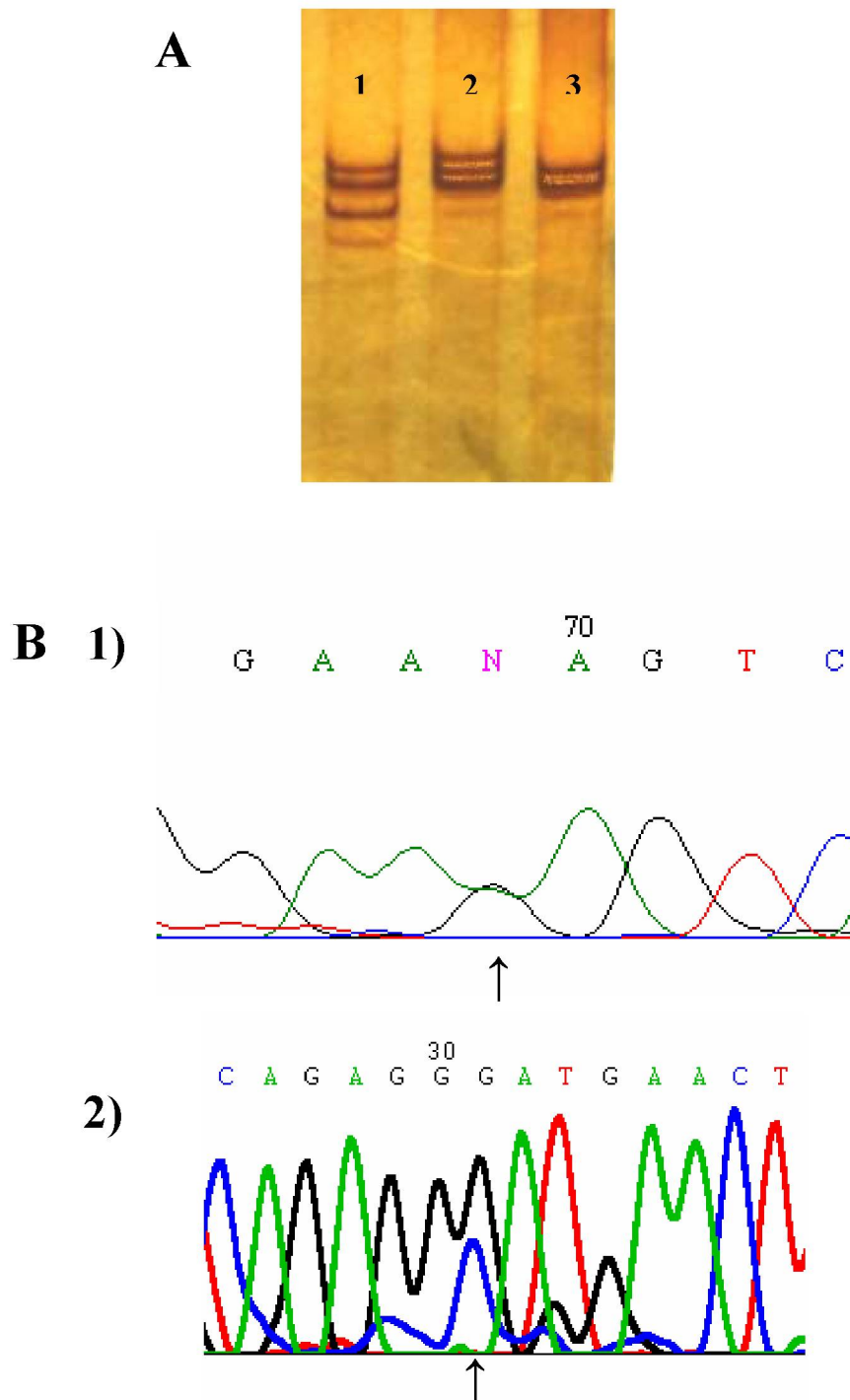


Figura 7. Variantes *K12R* e *G15G*. A) Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt –42 a 204. 1- Heterozigoto *K12R/U*, 2- Heterozigoto *G15G/U* e 3- Controle usual homozigoto. B) Eletroferogramas das variantes: 1) Heterozigoto *K12R/U*; 2) Heterozigoto *G15G/U*. As setas indicam o ponto em que ocorreram as substituições de nucleotídeos.

Tabela 15. Frequências da mutação *D70G* nos indivíduos, de acordo com o grupo de atividade enzimática.

Atividade	Alelos	<i>D70G</i>	
		N ¹	% ± EP
Baixa	232	12	5,17 ± 1,45
Média	250	1	0,40 ± 0,40
Alta	240	0	—
Total	722	13	1,80 ± 0,49

¹N = número de alelos não usuais.

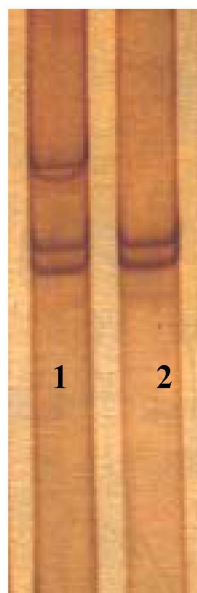


Figura 8. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 155 a 347. 1- Heterozigoto *D70G/U*, 2- Controle usual homozigoto.

Dos 13 heterozigotos para a mutação *D70G*, 12 apresentaram atividade baixa e um deles apresentou atividade média (doador 1243). Foi realizada uma comparação das frequências das variantes entre os grupos de atividade baixa e média ($\chi^2 = 9,34$; $p = 0,0022$), que mostrou que essas variantes se concentram significativamente no grupo de atividade baixa.

5.2.1.3. Nucleotídeos 304 a 535

Esse fragmento apresentou uma variante no grupo de atividade baixa, cujo seqüenciamento mostrou ser a mutação *A162A* (Figura 9), mas que já tinha sido encontrada, nessa mesma amostra, por SOUZA (2001), ao fazer a análise de PCR-SSCA de um fragmento amplificado de DNA, com extensão diferente do investigado neste trabalho. A alteração (doador 393) mostrou ser uma troca de T \rightarrow C no nucleotídeo 486 (aminoácido 162), que resulta em uma mutação sinônima (SOUZA et al., no prelo).

A frequência total dessa variante (*A162A*; $N = 732$) foi de $0,14\% \pm 0,13\%$. O valor da atividade enzimática dessa variante foi de 3,10 KU/L.

5.2.1.4. Nucleotídeos 481 a 719

A análise do DNA revelou quatro indivíduos com uma variação semelhante, encontrada no grupo de atividade baixa (Figura 10). O seqüenciamento mostrou ser uma variante já descrita, conhecida como resistente à succinilcolina (SC; *A184V*).

A frequência desse alelo no grupo de atividade baixa ($N = 230$) foi de $2,17\% \pm 0,96\%$ e no total de alelos da amostra ($N = 716$), essa frequência foi de $0,70\% \pm 0,31\%$ (Tabela 16). A atividade enzimática média (KU/L) da BChE dos indivíduos com a variante SC foi de $3,55 \pm 0,07$, com os valores variando de 3,46 KU/L a 3,78 KU/L. Três indivíduos são heterozigotos (doadores: 77, 148, 1244) e um é homozigoto (doador 2310) para essa variante. As atividades da BChE do doador homozigoto e dos três heterozigotos foram de 3,47 KU/L, 3,49 KU/L, 3,46 KU/L e 3,78 KU/L, respectivamente.

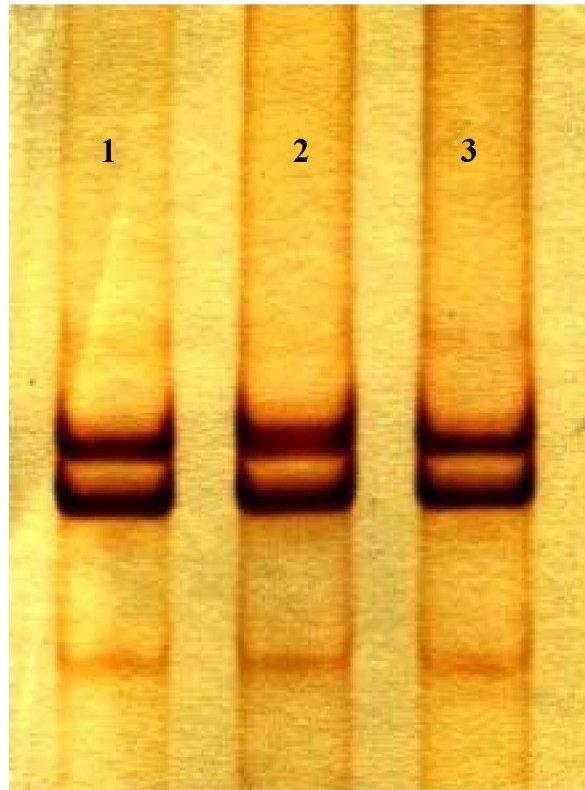


Figura 9. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 304 a 535. 1 e 3- Controle usual homozigoto e 2- Heterozigoto *A162A/U*.

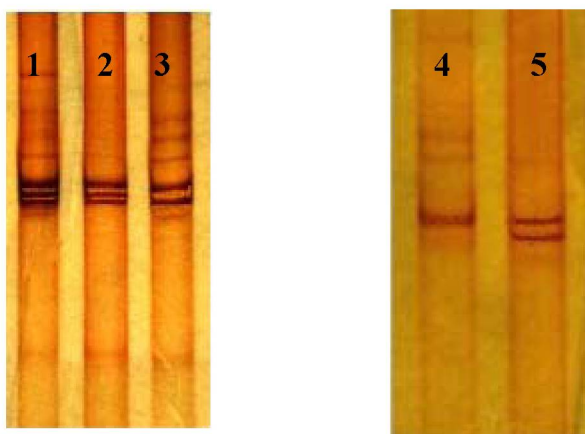


Figura 10. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 481 a 719. 1 e 2 - Heterozitogo *A184V/U* ; 4 – Homozigoto *A184V/A184V* ; 3 e 5 - Controle usual homozigoto.

Tabela 16. Frequências de variações encontradas no segmento entre os nucleotídeos 481 e 719, de acordo com o grupo de atividade enzimática.

Atividade	Alelos	<i>A184V</i> (SC)	
		N ¹	% \pm EP
Baixa	230	5	2,17 \pm 0,96%
Média	244	—	
Alta	242	—	
Total	716	5	0,70 \pm 0,31

¹N número de alelos não usuais.

5.2.1.5. Nucleotídeos 659 a 876

Foram encontrados 9 indivíduos com variantes não-usuais: 2 heterozigotos para a mutação *T243M* (F-1; doadores 910 e 2545), no grupo de atividade baixa, e 7 doadores de sangue (1406, 1408, 1647, 2716, 2765, 2832, 2841), distribuídos nos três grupos de atividade, que após seqüenciamento revelaram ser heterozigotos para o alelo *E255D*, descrito por PRIMO-PARMO et al. (1996; Tabela 17 e Figura 8). A freqüência total da mutação *E255D* foi de $0,98\% \pm 0,37\%$ e a freqüência total de *T243M* foi de $0,28\% \pm 0,19\%$.

A freqüência total de variantes nesse segmento foi $1,26\% \pm 0,42\%$. A atividade média em KU/L das variantes foi de $3,79 \pm 0,31$, com os valores variando entre 2,26 KU/L e 5,39 KU/L. Quando o valor da atividade enzimática da variante *E255D* foi calculado, obteve-se uma atividade média de $4,13 \pm 0,24$ KU/L. Os heterozigotos para a variante *T243M* apresentaram atividades de 2,26 KU/L e 2,90 KU/L.

5.2.1.6. Nucleotídeos 835 a 1059

Por intermédio de PCR-SSCA, foi encontrado um mesmo padrão de bandas em dois indivíduos: um no grupo de atividade baixa e outro no grupo de atividade média. Entretanto, o seqüenciamento demonstrou serem duas variantes diferentes e ainda não descritas (Tabela 18 e Figura 12). A variante *V294M* mostrou alteração no nucleotídeo 880 levando a uma mudança do códon GTG para ATG e a troca de valina para metionina. A outra variante, *G333C*, mostrou uma substituição de glicina para cisteína, devido a uma mudança no nucleotídeo 997, alterando o códon GGT para TGT. O heterozigoto para a variante *G333C* mostrou atividade de 3,09 KU/L e o heterozigoto quanto à variante *V294M* teve atividade de 4,51 KU/L.

A freqüência alélica de cada uma dessas variantes foi de $0,14\% \pm 0,14\%$.

Tabela 17. Frequências de variações, encontradas no segmento entre os nucleotídeos 659 e 876, de acordo com o grupo de atividade enzimática.

Atividade	Alelos	<i>T243M</i> (F-1)		<i>E255D</i>	
		N ¹	% ± EP	N ¹	% ± EP
Baixa	228	2	0,88 ± 0,62	3	1,32 ± 0,75
Média	248	0	—	3	1,21 ± 0,69
Alta	240	0	—	1	0,42 ± 0,41
Total	716	2	0,28 ± 0,19	7	0,98 ± 0,37

¹N = número de alelos não usuais.

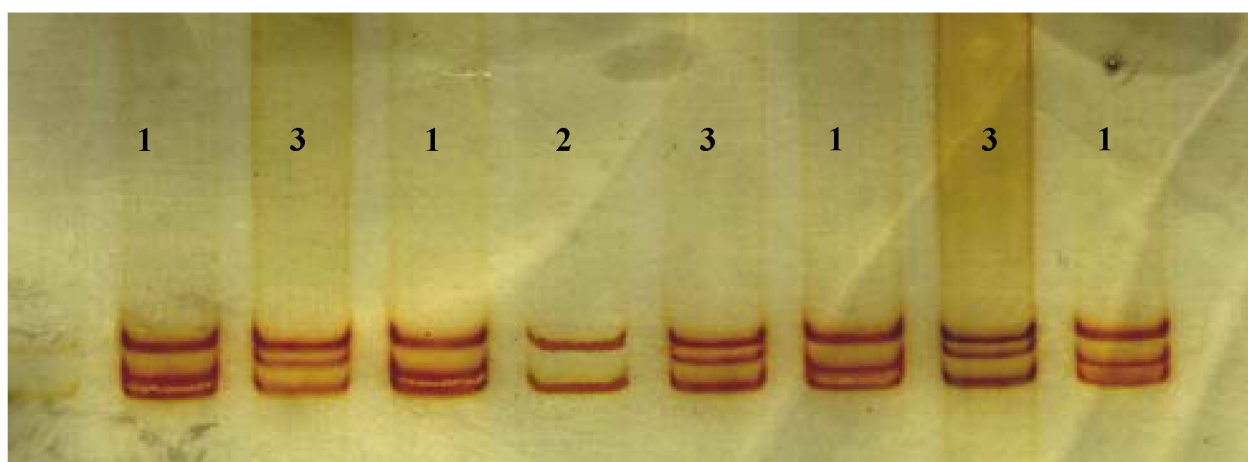


Figura 11. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 659 a 876. 1- Heterozigoto *E255D/U*, 2- Controle usual homozigoto e 3- Heterozigoto *T243M/U* (*F-1/U*).

Tabela 18. Frequências de variações encontradas no segmento entre os nucleotídeos 835 e 1059, de acordo com o grupo de atividade enzimática.

Atividade	Alelos	<i>V294M</i>		<i>G333C</i>	
		N ¹	% ± EP	N ¹	% ± EP
Baixa	232	0	—	1	0,43 ± 0,43
Média	248	1	0,40 ± 0,40	0	—
Alta	242	0	—	0	—
Total	722	1	0,14 ± 0,14	1	0,14 ± 0,14

¹N = número de alelos não usuais.

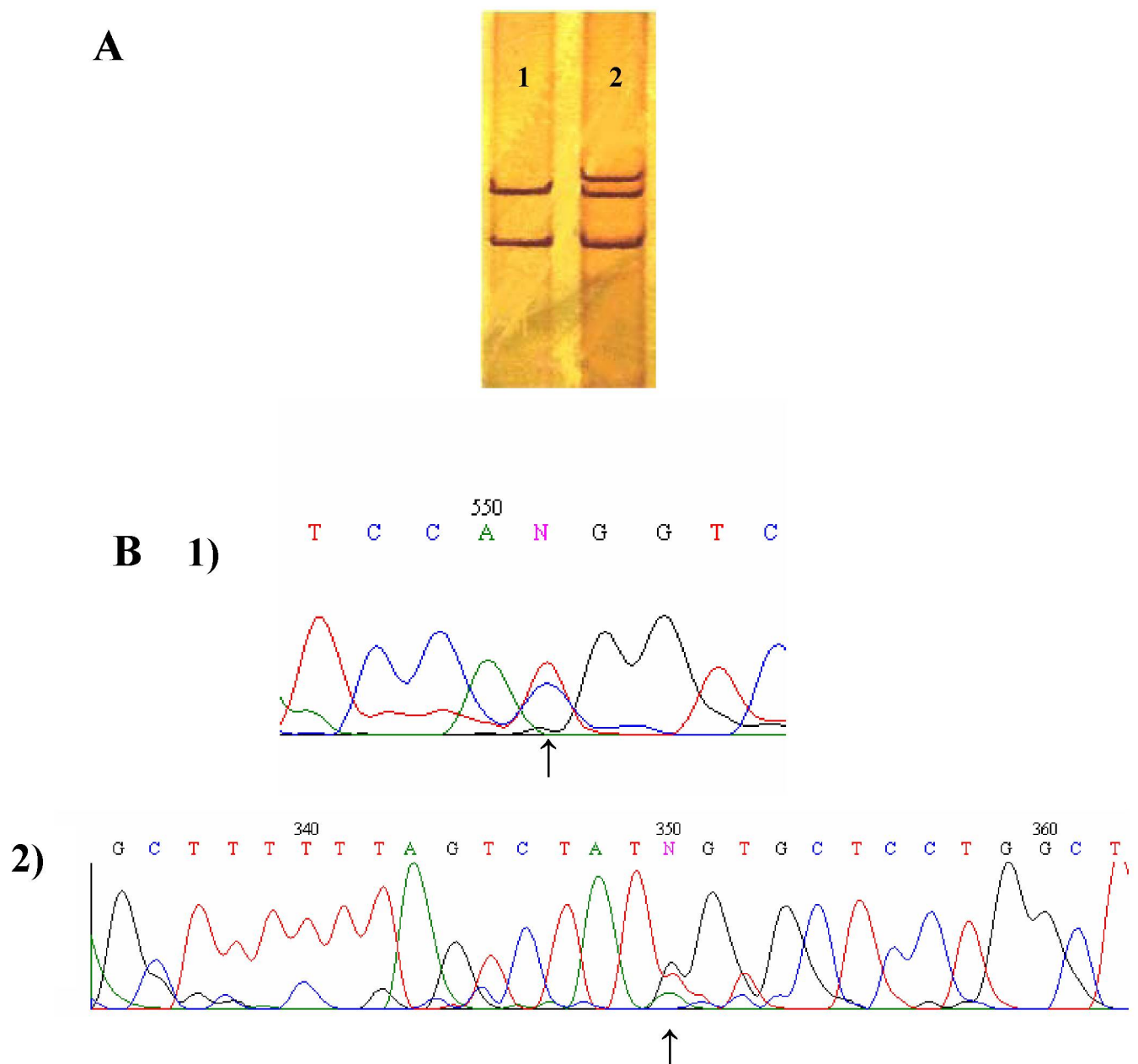


Figura 12. Variantes *V294M* e *G333C*. A) Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 835 e 1059. 1- Controle usual homozigoto e 2- Heterozigotos *V294M/U* e *G333C/U* (ambos apresentam o mesmo padrão de bandas). B) Eletroferogramas das variantes: 1) Heterozigoto *V294M/U* (fita antisense). 2) Heterozigoto *G333C/U*. As setas indicam o ponto em que ocorreram as substituições de nucleotídeos.

5.2.1.7. Nucleotídeos 1000 a 1235

Foram encontrados dois indivíduos portadores da mutação *G390V* (F-2, Figura 13), no grupo de atividade baixa, os quais (doadores 58 e 660) já haviam sido identificados em nosso laboratório por SOUZA (2001). A frequência total dessa variação nesse segmento ($N = 722$) foi de $0,28\% \pm 0,19\%$.

Quando se analisou a atividade enzimática dessas variantes não usuais observaram-se os valores de 3,65 KU/L e de 3,68 KU/L.

5.2.1.8. Nucleotídeos 1194 a 29 (intron 2)

Foi encontrado um doador de sangue (amostra 546), com uma variação (*R470W*, Figura 14), pertencente ao grupo de atividade baixa ($N = 232$, $0,43\% \pm 0,43\%$). O resultado do seqüenciamento revelou ser uma mutação nova, no nucleotídeo 1408, alterando o códon CGG para TGG e levando a uma substituição de aminoácidos (arginina para triptofano). No total de alelos da amostra ($N = 716$), a frequência dessa variante foi de $0,14\% \pm 0,14\%$. O valor da atividade enzimática observado foi de 4,00 KU/L.

5.2.1.9. Variabilidade e atividade da BChE

As médias de atividade das variantes não usuais e usuais, separadas por grupo de atividade enzimática estão mostradas na Tabela 19, assim como os valores de t , quando se comparam as médias de atividade. Dentro de cada classe de atividade enzimática, não houve diferença significativa entre as médias de atividade de usuais e não usuais. Verificou-se que apenas no total de indivíduos analisados houve diferença significativa entre as médias de usuais e não usuais ($t = 6,60$; $P < 10^{-6}$).

No exon 2 foram encontrados 34 genótipos não usuais, apresentando 11 tipos diferentes de mutações (Tabela 20). O grupo de atividade baixa concentrou o maior número de variantes (27 casos), assim como a maior variabilidade (10 tipos diferentes). Os grupo de atividade média e alta apresentaram, respectivamente 4 e 1 tipos diferentes de variantes não usuais.

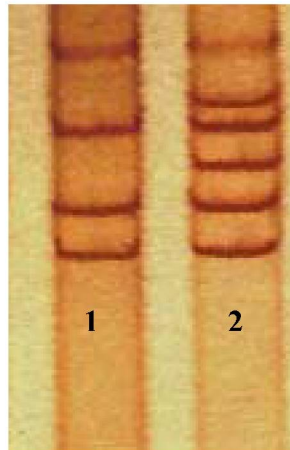
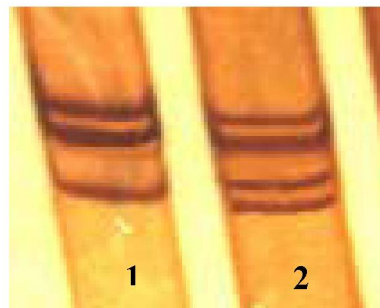


Figura 13. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 1000 a 1235. 1 - Controle usual homozigoto e 2- Heterozigoto *G390V/U* (*F-2/U*).

A



B 1)

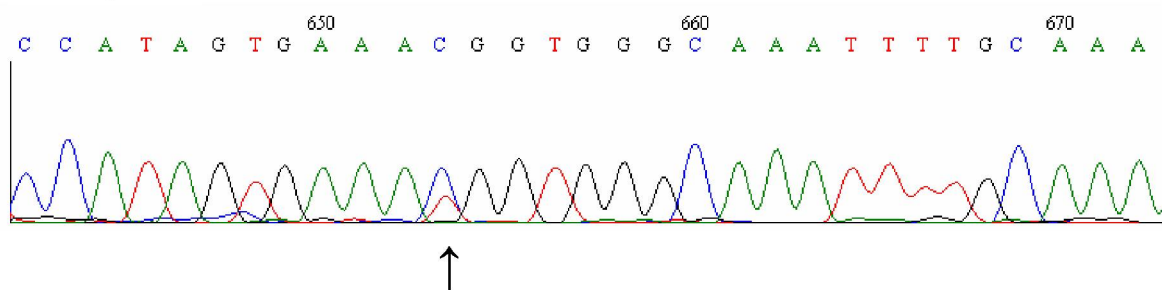


Figura 14. Variante *R470W*. A) Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o padrão de bandas do fragmento amplificado nt 1194 a 29 (intron 2). 1- Controle usual homozigoto e 2- Heterozigoto *R470W/U*. B) Eletroferograma do heterozigoto *R470W/U*. A seta indica o ponto em que ocorreu a substituição de nucleotídeo.

Tabela 19. Médias de atividade em KU/L das variantes não usuais e usuais do exon 2, classificadas por grupo de atividade enzimática.

Grupo de atividade		N ¹	Atividade (M ± E.P.)	Min – Max	t (p)
Baixa	Não usual	27	3,17 ± 0,11	1,90 – 4,00	1,73 (p = 0,09)
	Usual	93	3,39 ± 0,06	0,16 – 4,00	
	Total	120	3,34 ± 0,05	0,16 – 4,00	
Média	Não usual	6	4,58 ± 0,07	4,43 – 4,83	1,25 (p = 0,21)
	Usual	120	4,65 ± 0,01	4,40 – 4,90	
	Total	126	4,65 ± 0,01	4,40 – 4,90	
Alta	Não usual	1	5,39	—	0,85 (p = 0,40)
	Usual	123	5,84 ± 0,05	5,31 – 8,21	
	Total	124	5,84 ± 0,05	5,31 – 8,21	
Total	Não usual	34	3,49 ± 0,14	1,90 – 5,39	6,60 (p < 10 ⁻⁶)
	Usual	336	4,74 ± 0,06	0,16 – 8,21	
	Total	370	4,62 ± 0,06	0,16 – 8,21	

¹N = total de indivíduos analisados ao nível do DNA.

Tabela 20. Frequências de variantes encontradas em cada segmento analisado do exon 2, de acordo com os três grupos de atividade enzimática.

Fragmento	Nº de indivíduos com alelos não usuais			Total de alelos analisados	Frequencia alélica (% ± EP)	Nº de variantes não usuais diferentes
	Atividade					
	Baixa	Média	Alta			
EXON 2						
Nt -42 a 204	1	1	0	732	0,27 ± 0,19	2
Nt 155 a 347	12	1	0	722	1,80 ± 0,49	1
Nt 304 a 535	1	0	0	732	0,14 ± 0,13	1
Nt 481 a 719	4 ^a	0	0	716	0,70 ± 0,31	1
Nt 659 a 876	5	3	1	716	1,26 ± 0,42	2
Nt 835 a 1059	1	1	0	722	0,28 ± 0,19	2
Nt 1000 a 1235	2	0	0	722	0,28 ± 0,19	1
Nt 1194 a 29 (intron 2)	1	0	0	716	0,14 ± 0,14	1
Total	27	6	1		4,87 ± 0,80 ^b	11

^a Inclui um homozigoto; ^b Para o cálculo do E.P. utilizou-se o número médio de 722,25 alelos.

Em todos os segmentos analisados foi encontrado, pelo menos, uma variante não usual. Os segmentos com a maior frequência de alelos não usuais foram os compreendidos entre os nt 155 a 347 ($1,80\% \pm 0,49\%$) e nt 659 a 876 ($1,26\% \pm 0,42\%$), que atingem valores polimórficos, seguidos dos segmentos nt 481 a 719, nt 835 a 1059, nt 1000 a 1235, nt -42 a 204, nt 304 a 535 e nt 1194 a 29 (intron 2), com frequências de $0,70\% \pm 0,31\%$, $0,28\% \pm 0,19\%$, $0,28\% \pm 0,19\%$, $0,27\% \pm 0,19\%$, $0,14\% \pm 0,14\%$ e $0,14\% \pm 0,14\%$.

5.4.2. Exon 4

O número de alelos analisados em cada grupo de atividade enzimática está mostrado na Tabela 21 e os padrões eletroforéticos de cada genótipo são mostrados na figura 15.

O alelo *A539T*, responsável pela mutação K, apareceu em uma frequência de $32,63\% \pm 3,05\%$, $12,10\% \pm 2,07\%$ e $8,47\% \pm 1,40\%$ nos grupos de atividade baixa, média e alta, respectivamente. A frequência total dessa variação foi de $17,49\% \pm 1,40\%$. Pode-se verificar, ainda, que existe diferença significativa no número de variantes não usuais entre os grupos de atividade baixa e média e entre baixa e alta, quando se analisa o valor do χ^2 (Tabela 21).

Em relação à atividade enzimática média total para os grupos usuais e não usuais (*U/A539T* e *A539T/A539T*), obteve-se um valor em KU/L de $4,87\% \pm 0,07\%$, $4,21\% \pm 0,10\%$ e $3,41\% \pm 0,23\%$, respectivamente (Tabela 22), com os valores variando de 0,16 KU/L a 8,21 KU/L para o grupo homozigoto usual, 1,96 KU/L a 6,38 KU/L para os heterozigotos e 1,90 KU/L a 5,78 KU/L para o grupo homozigoto K. Ao analisar a atividade enzimática média dentro de cada grupo (baixa, média, alta e total) para usuais e não usuais, verificou-se que houve diferenças significativas entre todos os genótipos apenas no total da amostra (Tabela 22).

Tabela 21. Frequências dos genótipos e do alelo *A539T* (mutação K) nos três grupos de atividade enzimática.

Atividade	N ¹	<i>U/U</i>	<i>U/A539T</i>	<i>A539T/A539T</i>	Mutação <i>A539T</i> (% ± EP)	χ^2 ⁽²⁾
Baixa	236	55	49	14	32,63 ± 3,05	29,60 (p < 10 ⁻⁴) 1,77 (p = 0,18)
Média	248	94	30	0	12,10 ± 2,07	
Alta	248	104	19	1	8,47 ± 1,77	
Total	732	253	98	15	17,49 ± 1,40	

¹N = número de alelos

² Atividade Baixa x Alta: $\chi^2 = 43,71$ (p < 10⁻⁴).

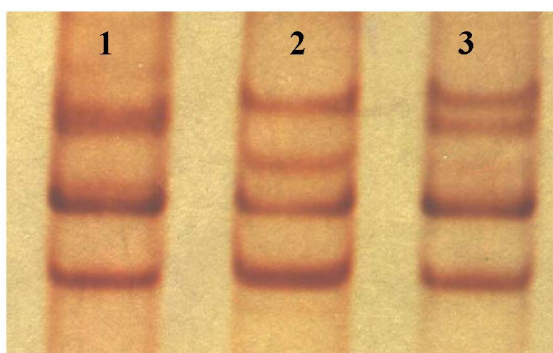


Figura 15. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, após eletroforese de SSCA, mostrando o fragmento amplificado nt -31 (intron 3) a 1758 do exon 4. 1- Controle usual homozigoto; 2- Homozigoto *A539T/A539T* e 3- Heterozigoto *A539T/U*.

Tabela 22. Médias de atividade dos três genótipos quanto à variação *A539T* (K) do exon 4, separadas por grupo de atividade enzimática.

Grupo de atividade		N ¹	Atividade (KU/L) (M ± E.P.)	Min – Max	t (p) ²
Baixa	<i>A539T/A539T</i>	14	3,24 ± 0,16	1,90 – 3,99	1,02 (p = 0,31)
	<i>U/A539T</i>	49	3,40 ± 0,07	1,96 – 3,99	
	<i>U/U</i>	55	3,32 ± 0,09	0,16 – 4,00	0,67 (p = 0,50)
	Total	118	3,34 ± 0,05	0,16 – 4,00	
Média	<i>A539T/A539T</i>	0	—	—	0,58 (p = 0,56)
	<i>U/A539T</i>	30	4,64 ± 0,03	4,43 – 4,87	
	<i>U/U</i>	94	4,65 ± 0,01	4,40 – 4,90	
	Total	124	4,65 ± 0,01	4,40 – 4,90	
Alta	<i>A539T/A539T</i>	1	5,78	—	1,74 (p = 0,08)
	<i>U/A539T</i>	19	5,65 ± 0,06	5,33 – 6,38	
	<i>U/U</i>	104	5,88 ± 0,06	5,31 – 8,21	
	Total	124	5,84 ± 0,05	5,31 – 8,21	
Total	<i>A539T/A539T</i>	15	3,41 ± 0,23	1,90 – 5,78	3,04 (p = 0,003)
	<i>U/A539T</i>	98	4,21 ± 0,10	1,96 – 6,38	
	<i>U/U</i>	253	4,87 ± 0,07	0,16 – 8,21	5,19 (p < 10 ⁻⁶)
	Total	366	4,63 ± 0,06	0,16 – 8,21	

¹N = números de indivíduos

²Atividades enzimáticas médias de *U/U* X *A539T/A539T* (no grupo de atividade baixa): t = 0,40; (p = 0,69).

Atividades enzimáticas médias de *U/U* X *A539T/A539T* (na amostra total): t = 5,06 (p < 10⁻⁵).

5.4.3. Heterozigosidade

Em relação ao número de variantes encontradas, 20 doadores de sangue apresentaram variações não usuais tanto no exon 2 quanto no exon 4 (Tabela 23).

Considerando-se os exons 2 e 4 separadamente, o número de indivíduos com variações não usuais apenas no exon 2 foi de 14 (Tabela 23) e apenas no exon 4 foi de 93 ($113 - 20 = 93$; Tabela 22), respectivamente. Assim, foram encontrados 127 indivíduos com variações não usuais.

Para o cálculo da heterozigosidade do exon 2, foi considerado cada fragmento de DNA separadamente. Em seguida, as frequências de todos os fragmentos (nt -42 a 204: 0,55%; nt 155 a 347: 3,60%; nt 304 a 535: 0,27%; nt 481 a 719: 0,84%; nt 659 a 876: 2,51%; nt 835 a 1059: 0,55%; nt 1000 a 1235: 0,55% e nt 1194 a 29: 0,28%) foram somadas e obteve-se um valor de heterozigosidade total para o exon 2 de 9,15%.

O valor de heterozigosidade obtido para o exon 4 foi de 26,78% (98/366). Para se calcular a heterozigosidade dos exons 2 e 4, somaram-se os valores de cada exon, obtendo-se um valor de 35,93%. Nesse total estão incluídos 15 indivíduos duplo heterozigotos para os exons 2 e 4 simultaneamente. O exon 2 é responsável por cerca de 25% dessa heterozigosidade, enquanto o exon 4 representa aproximadamente 75%.

5.4.4. Desequilíbrio de ligação

Das 12 variações não usuais nessa amostra, foram feitas estimativas de frequências de haplótipos e de desequilíbrio de ligação apenas nos casos das variantes *D70G* (atípica) e *E255D* do exon 2, que aparentavam estar em desequilíbrio de ligação com a variante *A539T* (K), do exon 4. Antes de se estimar desequilíbrio de ligação, verificou-se que cada uma das três distribuições genotípicas separadamente encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências dos haplótipos e o desequilíbrio de ligação, no que se refere às variantes *D70G* e *A539T* (nts 209 e 1615) e *E255D* e *A539T* (nts 765 e 1615), foram estimadas com base nos dados de genótipos das Tabelas 24 e 25, respectivamente, utilizando-se o programa Arlequin.

Tabela 23. Número de indivíduos com variantes no exon 2 e/ou exon 4 do gene *BCHE*.

N ¹	Exon 2		Exon 4 (nt 1615)
	nt	Genótipo	Genótipo
1	35	<i>U/K12R</i>	<i>U/U</i>
1	45	<i>U/G15G</i>	<i>U/U</i>
1	209	<i>U/D70G</i>	<i>U/U</i>
9	209	<i>U/D70G</i>	<i>U/A539T</i>
3	209	<i>U/D70G</i>	<i>A539T/A539T</i>
1	486	<i>U/A162A</i>	<i>U/A539T</i>
2	551	<i>U/A184V</i>	<i>U/U</i>
1	551	<i>U/A184V</i>	<i>U/A539T</i>
1	551	<i>A184V/A184V</i>	<i>U/U</i>
1	728	<i>U/T243M</i>	<i>U/U</i>
1	728	<i>U/T243M</i>	<i>U/A539T</i>
2	765	<i>U/E255D</i>	<i>U/U</i>
3	765	<i>U/E255D</i>	<i>U/A539T</i>
2	765	<i>U/E255D</i>	<i>A539T/A539T</i>
1	880	<i>U/V294M</i>	<i>U/U</i>
1	997	<i>U/G333C</i>	<i>U/U</i>
2	1169	<i>U/G390V</i>	<i>U/U</i>
1	1408	<i>U/R470W</i>	<i>U/U</i>

¹ Número de indivíduos.

Tabela 24. Genótipos considerando-se as variantes *D70G* (nt 209) e *A539T* (nt 1615).

N ¹	Exon 2 (nt 209)	Exon 4 (nt 1615)
1	<i>U/D70G</i>	<i>U/U</i>
9	<i>U/D70G</i>	<i>U/A539T</i>
3	<i>U/D70G</i>	<i>A539T/A539T</i>
251	<i>U/U</i>	<i>U/U</i>
83	<i>U/U</i>	<i>U/A539T</i>
11	<i>U/U</i>	<i>A539T/A539T</i>
Total	358	

¹Número de indivíduos.**Tabela 25.** Genótipos considerando-se as variantes *E255D* (nt 765) e *A539T* (nt 1615).

N ¹	Exon 2 (nt 765)	Exon 4 (nt 1615)
2	<i>U/E255D</i>	<i>U/U</i>
3	<i>U/E255D</i>	<i>U/A539T</i>
2	<i>U/E255D</i>	<i>A539T/A539T</i>
247	<i>U/U</i>	<i>U/U</i>
90	<i>U/U</i>	<i>U/A539T</i>
12	<i>U/U</i>	<i>A539T/A539T</i>
Total	362	

¹Número de indivíduos.

Quando se consideraram os dados da Tabela 24, em relação aos nucleotídeos 209 e 1615, encontraram-se os seguintes haplótipos com as respectivas frequências: *U;U* (83,08%), *U;A539T* (15,11%), *D70G;U* (0,16%) e *D70G;A539T* (1,65%). Pelo valor do qui-quadrado ($\chi^2_{(1)} = 54,17$; $p = 0,000$), nota-se que há desequilíbrio de ligação quanto às variações desses dois nucleotídeos, com um excesso de combinações em cis. O valor de D' obtido (D/D_{\max}) foi de 90,76%.

Examinando-se os genótipos quanto aos nucleotídeos 765 e 1615 (Tabela 25), encontraram-se os seguintes haplótipos e frequências: *U;U* (82,69%), *U;A539T* (16,33%), *E255D;U* (0,32%) e *E255D;A539T* (0,66%). Neste caso, também se observa um desequilíbrio de ligação, com um excesso de combinações em cis ($\chi^2_{(1)} = 14,85$; $p = 0,0001$). O valor de D' obtido foi de 65,58%.

5.5. Expressão gênica

5.5.1. Seqüenciamento do gene *BCHE* contendo as mutações novas

Após mutagênese sítio-dirigida, foi realizado seqüenciamento de todo o gene *BCHE* para assegurar que apenas a mutação desejada estava presente. Com exceção de *G333C* e de *V294M*, os demais mutantes foram obtidos na primeira ou na segunda tentativa de mutagênese.

No caso referente à mutação *G333C*, na segunda tentativa de mutagênese essa mutação foi induzida. Entretanto, uma outra mutação também foi induzida no mesmo experimento. Em vista disso, três tentativas foram realizadas para eliminar essa outra mutação, sem se obter sucesso. Partindo-se novamente do gene usual, foi feita uma quinta mutagênese sítio-dirigida, que induziu apenas a mutação *G333C*.

A indução da mutação *V294M* foi bem sucedida apenas na terceira mutagênese sítio-dirigida.

5.5.2. Atividade frente ao substrato butiriltiocolina

De todas as 7 variantes novas (4 do presente trabalho e 3 do trabalho de tese de Souza, 2001), que foram expressas em células 293T e CHO (Figuras 16 a 22), apenas a variante *E90D* (SOUZA et al., no prelo) não mostrou atividade da BChE.

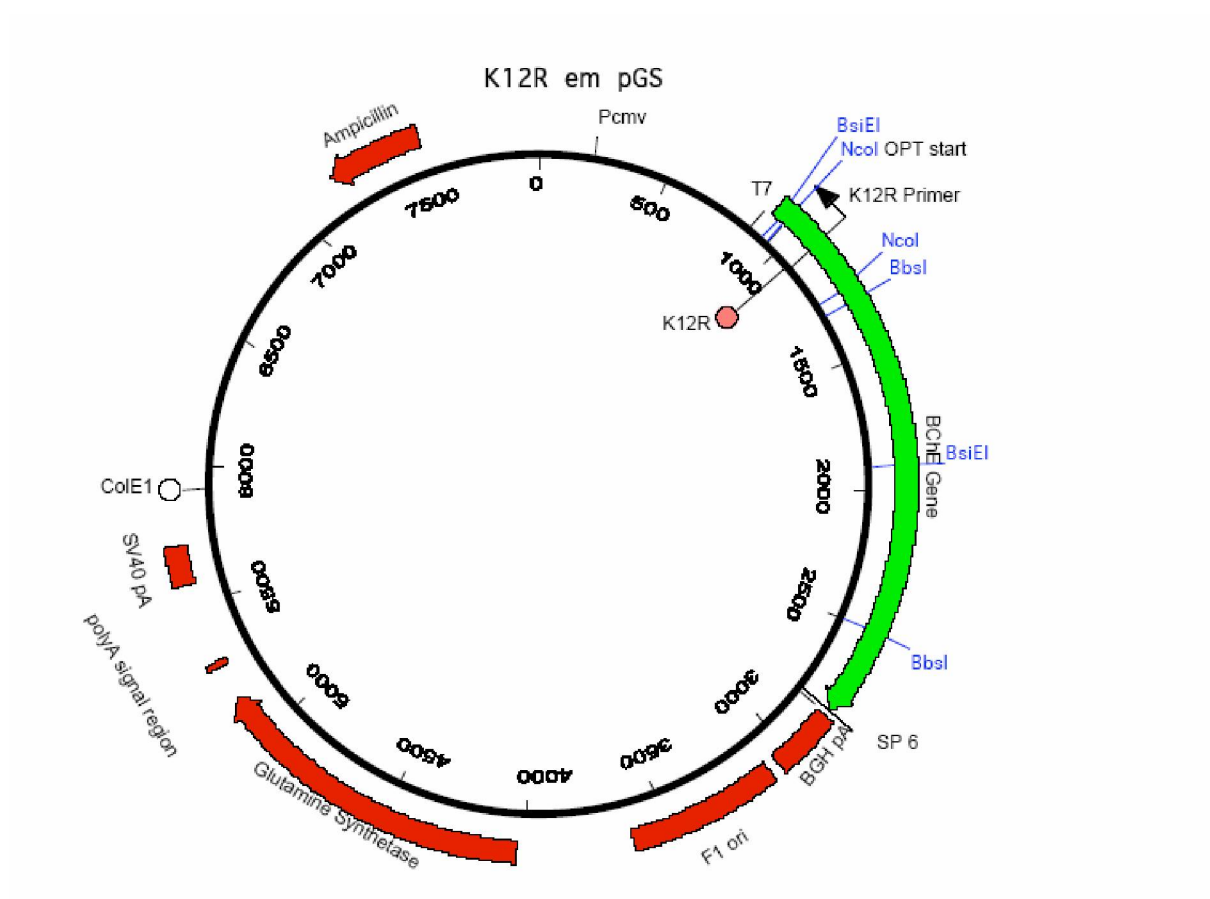


Figura 16. Variante *K12R* em vetor pGS. São mostradas a localização e a orientação do iniciador mutagênico, utilizado na mutagênese sítio-dirigida, assim como características do vetor e a posição dos outros iniciadores, utilizados tanto na mutagênese como no seqüenciamento do gene contido no vetor.

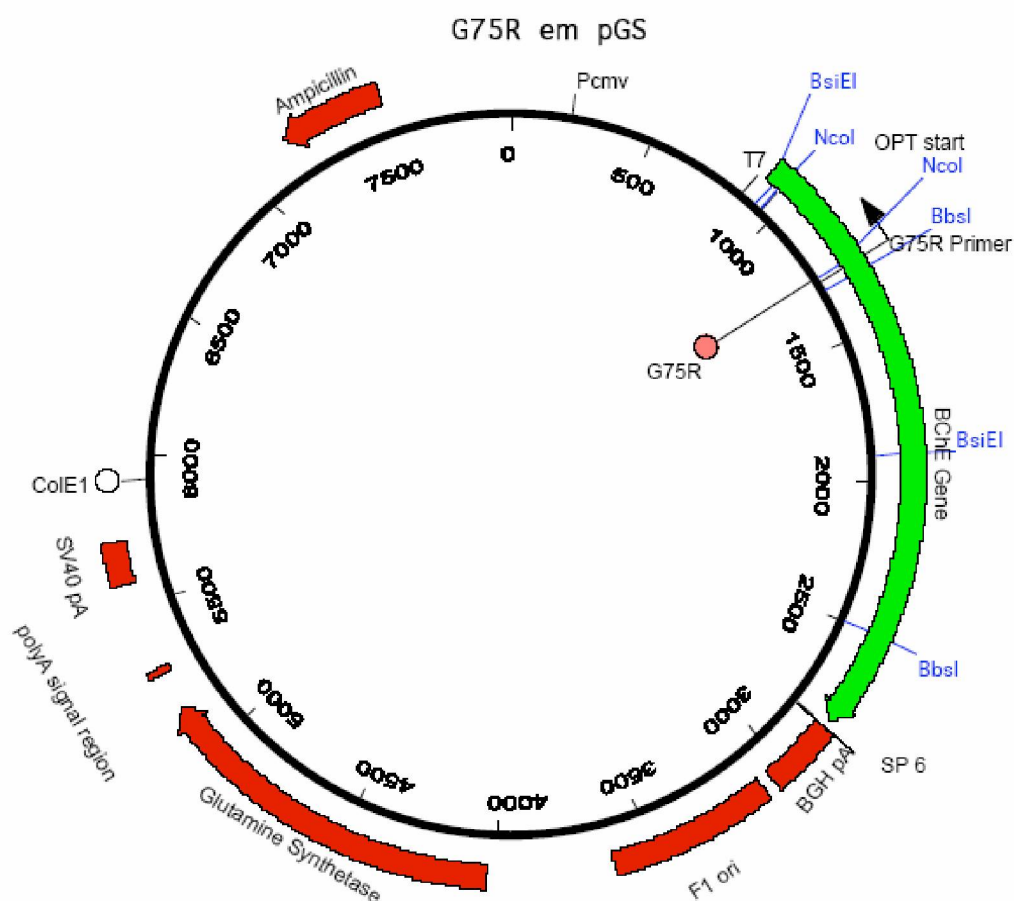


Figura 17. Variante *G75R* em vetor pGS. São mostradas a localização e a orientação do iniciador mutagênico, utilizado na mutagênese sítio-dirigida, assim como características do vetor e a posição dos outros iniciadores, utilizados tanto na mutagênese como no seqüenciamento do gene contido no vetor.

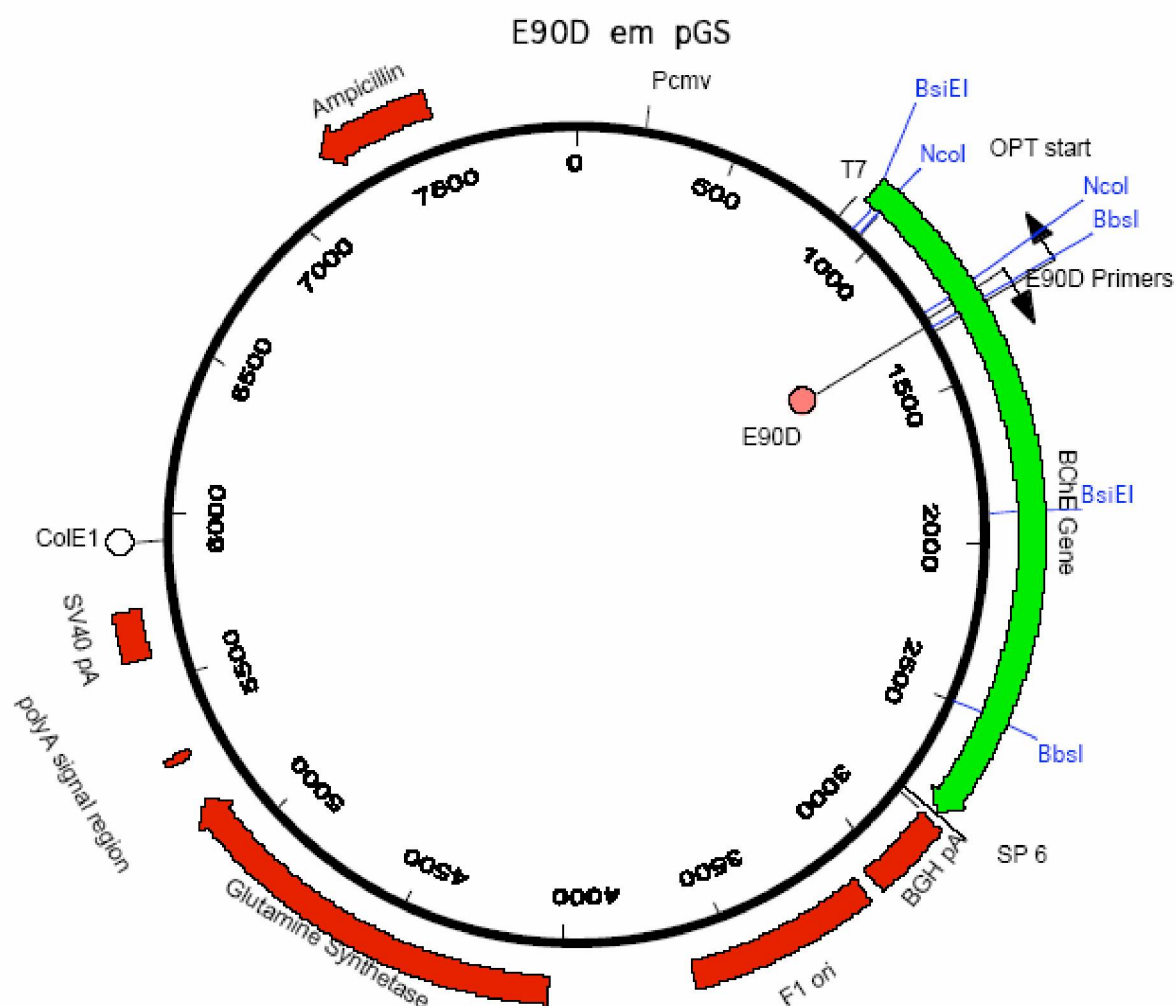


Figura 18. Variante *E90D* em vetor pGS. São mostradas a localização e a orientação dos iniciadores mutagênicos, utilizados na mutagênese sítio-dirigida, assim como características do vetor e a posição dos outros iniciadores, utilizados no sequenciamento do vetor. O sítio de restrição da enzima *Bbs* I entre os nucleotídeos 1000 e 1500 foi modificado.

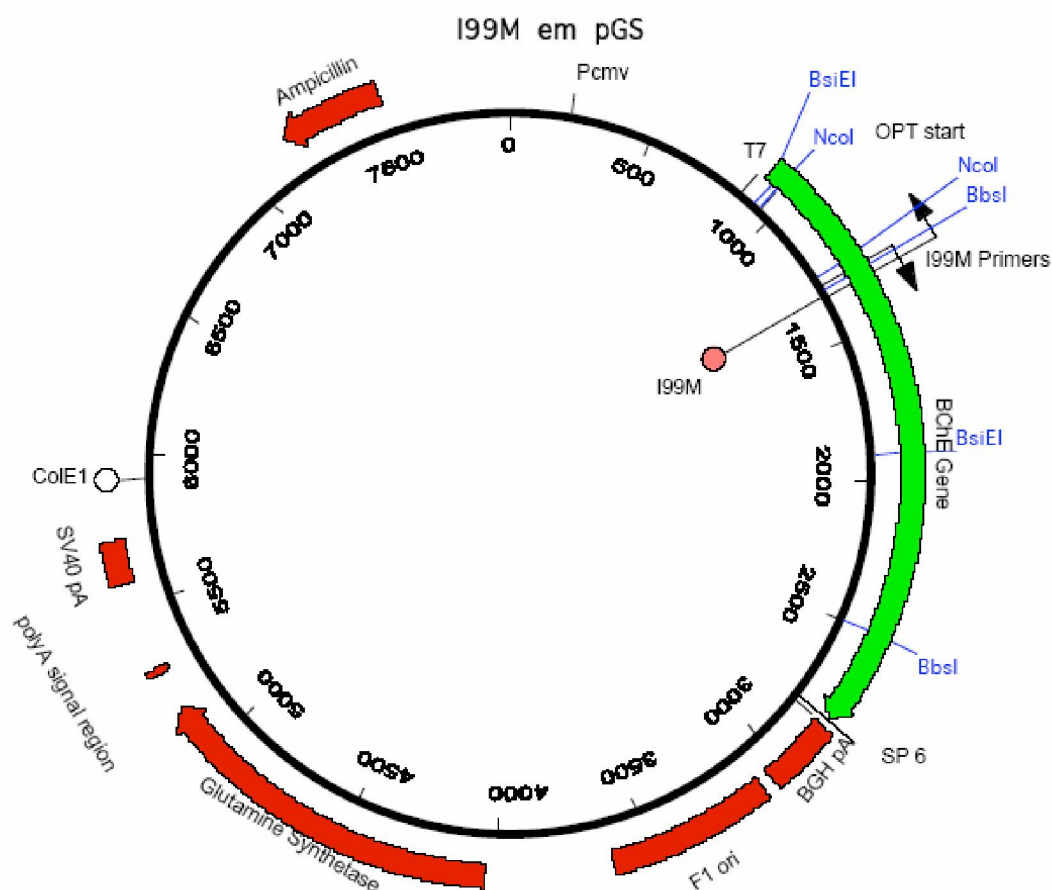


Figura 19. Variante *199M* em vetor pGS. São mostradas a localização e a orientação dos iniciadores mutagênicos, utilizados na mutagênese sítio-dirigida, assim como características do vetor e a posição dos iniciadores utilizados no seqüenciamento do vetor e outras. O sítio de restrição da enzima *Bbs* I entre os nucleotídeos 1000 e 1500 foi modificado.

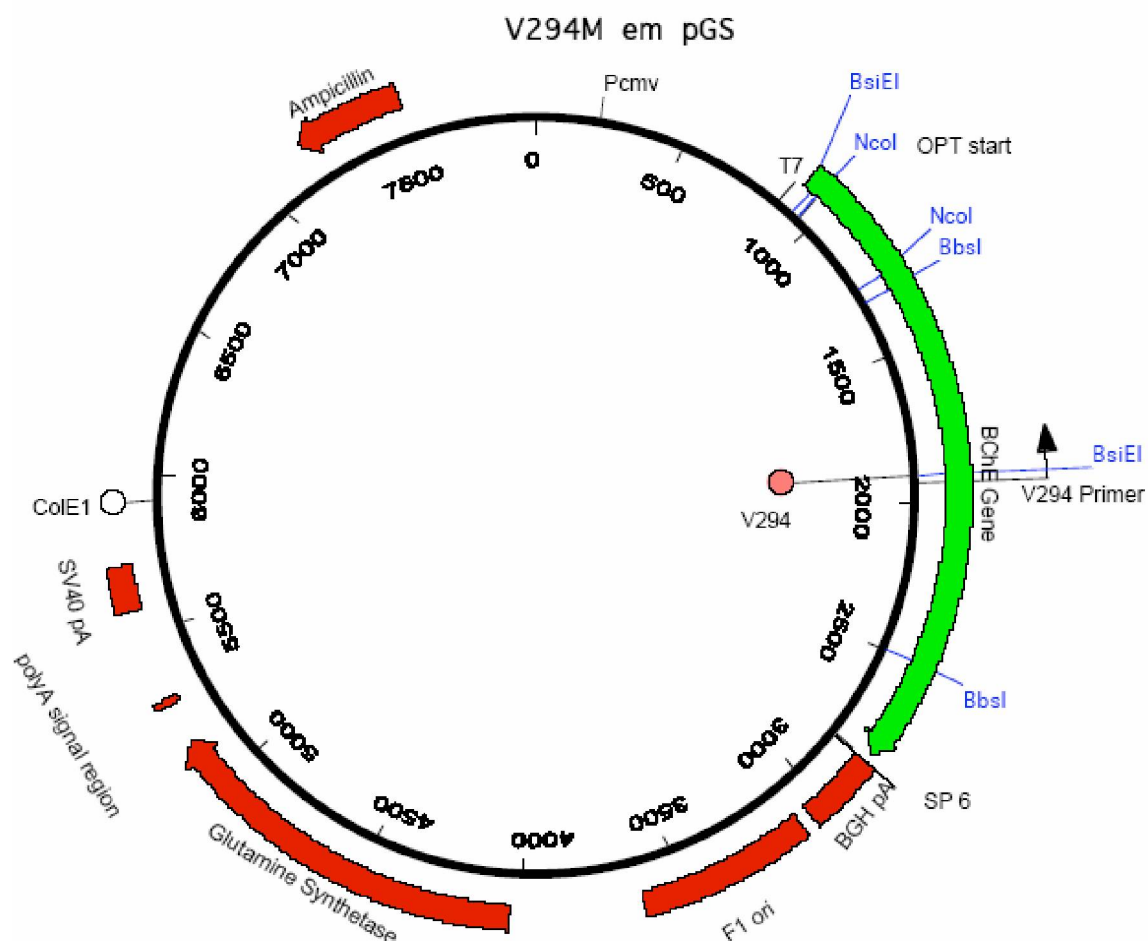


Figura 20. Variante *V294M* em vetor pGS. São mostradas a localização e a orientação do iniciador mutagênico, utilizado na mutagenese sítio-dirigida, assim como características do vetor e a posição dos outros iniciadores, utilizados tanto na mutagenese como no seqüenciamento do gene contido no vetor.

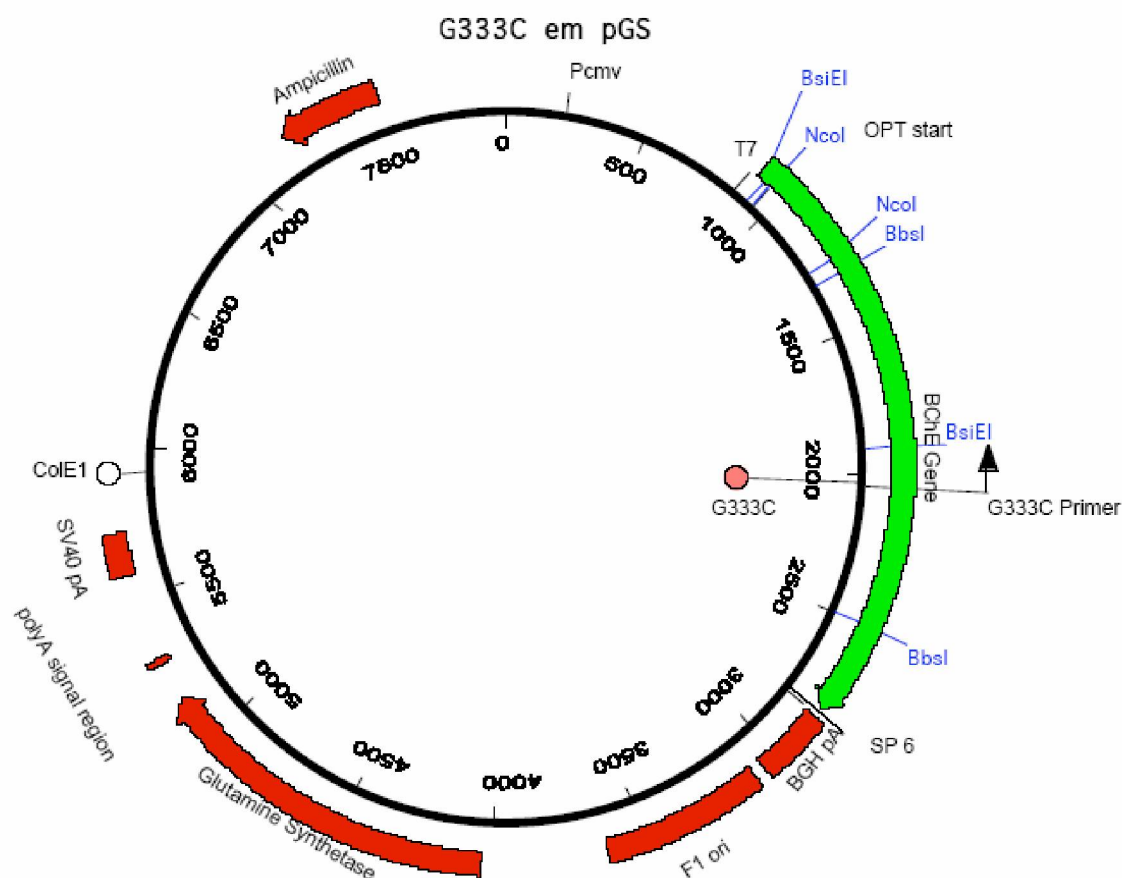


Figura 21. Variante *G333C* em vetor pGS. São mostradas a localização e a orientação do iniciador mutagênico, utilizado na mutagênese sítio-dirigida, assim como características do vetor e a posição dos outros iniciadores, utilizados tanto na mutagênese como no seqüenciamento do gene contido no vetor.

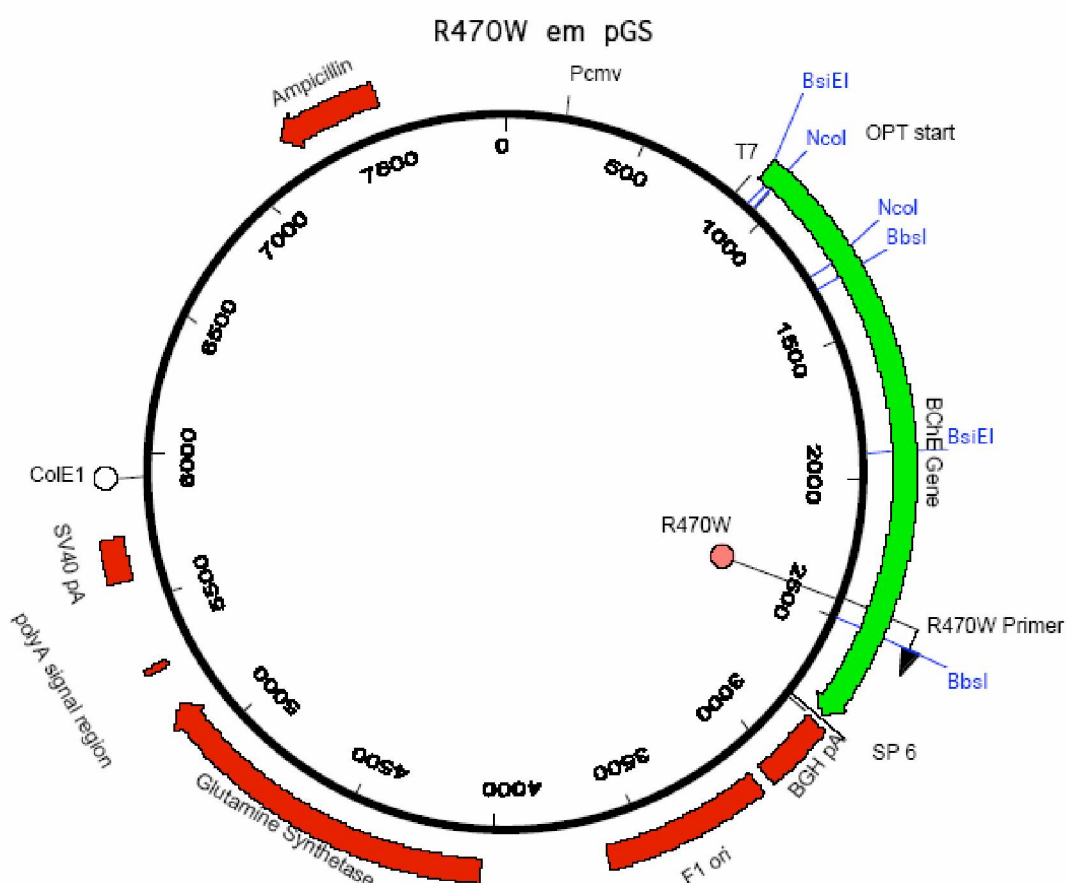


Figura 22. Variante *R470W* em vetor pGS. São mostradas a localização e a orientação do iniciador mutagênico, utilizado na mutagênese sítio-dirigida, assim como características do vetor e a posição dos outros iniciadores, utilizados tanto na mutagênese como no seqüenciamento do gene contido no vetor.

Nota-se que a variante *G333C* apresentou atividade enzimática muito baixa.

Nota-se que a variante *G333C* apresentou atividade enzimática muito baixa.

Os valores da atividade do tipo usual e das variantes não usuais, que são mostrados na Tabela 26, têm apenas o objetivo de evidenciar a ocorrência de variante sem atividade enzimática, como é o caso de *E90D*.

5.5.3. K_m verificado com o substrato butiriltiocolina

Os valores de K_m , V_{max} , K_{ss} e b das variantes, que apresentaram atividade, foram calculados por meio de sucessivas medidas de variação de absorbância da hidrólise de BTC, em diferentes concentrações, pela BChE e são mostrados na Tabela 27.

5.5.4. Valores de k_{cat}

Os valores de absorbância, com diferentes concentrações de CPO, para a enzima usual e para cada variante não usual expressa, assim como a determinação do ponto em que ocorre inibição total da enzima (ponto final), são mostrados nas Tabelas 28 a 34 e nas figuras 23 a 29.

Como a concentração da enzima usual era conhecida no experimento (0,168 nM), foi feita uma correção de valores, de modo que o ponto final para a enzima usual foi determinado como sendo 0,17 nM de CPO ao invés de 0,295, como determinado pelo gráfico. Considerando-se que $0,17/0,295 = 0,576$, todas as variantes tiveram os valores do ponto final multiplicados por 0,576 para que as concentrações fossem calculadas (Tabela 35).

Os valores de k_{cat} , para a enzima usual e para as variantes não usuais expressas, são mostrados na Tabela 36. A enzima variante *G333C* apresentou um k_{cat} muito baixo (20% do valor apresentado pela enzima usual). Outra variante, que apresentou um valor de k_{cat} relativamente baixo, quando comparado ao da enzima usual, foi *G75R* (45% do valor da usual).

Tabela 26. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) e de atividade em U/mL

para as variantes expressas, enzima usual expressa (controle positivo) e células sem plasmídeo (controle negativo).

Variante	$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Atividade (U/mL)
<i>K12R</i>	0,1016	0,75
<i>G75R</i>	0,0545	0,40
<i>E90D</i>	0,0016	0,01
<i>I99M</i>	0,1647	1,21
<i>V294M</i>	0,0606	0,45
<i>G333C</i>	0,0114	0,08
<i>R470W</i>	0,2265	1,67
Usual	0,2333	1,72
Células sem plasmídeo	0,0024	0,02

Tabela 27. Valores de K_m , V_{max} , K_{ss} e b obtidos a partir de dados de experimentos com diferentes concentrações de butiriltiocolina (BTC).

Amostra	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M/min}$)	K_{ss} (μM)	b
<i>K12R</i>	31,66	0,56	1458,07	2,10
<i>G75R</i>	35,07	0,24	1355,11	3,37
<i>I99M</i>	21,90	0,82	1074,70	2,32
<i>V294M</i>	11,55	0,22	849,98	2,65
<i>G333C</i>	35,70	0,04	7678,07	7,05
<i>R470W</i>	16,71	0,73	969,34	2,46
Usual	27,31	0,51	1169,36	2,22

Tabela 28. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima usual, com respectivas concentrações de inibidor (CPO).

$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Concentração de CPO (nM)
0,11	0
0,1057	0,025
0,1018	0,05
0,0861	0,075
0,0812	0,1
0,0677	0,125
0,0572	0,15
0,0419	0,175
0,0352	0,2
0,0189	0,25

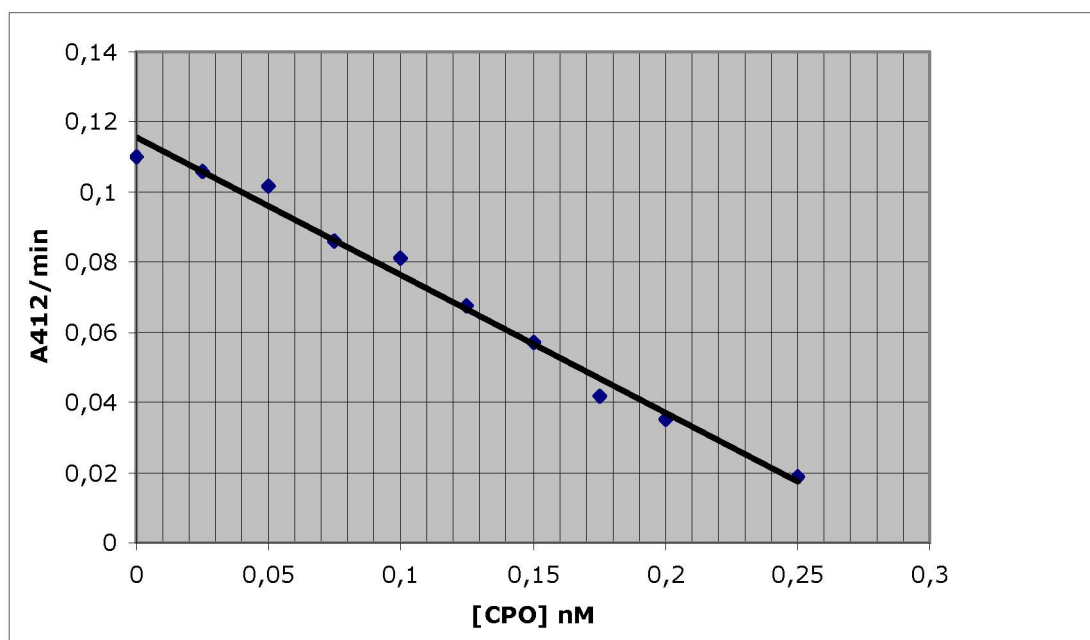


Figura 23. Gráfico obtido a partir da Tabela 28 para a determinação do ponto de inibição total da enzima usual pelo CPO.

Tabela 29. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima K12R, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).

$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Concentração de CPO (nM)
0,1152	0
0,1013	0,025
0,0939	0,05
0,0842	0,075
0,071	0,1
0,0605	0,125
0,0469	0,15
0,0361	0,175
0,0289	0,2
0,0236	0,25

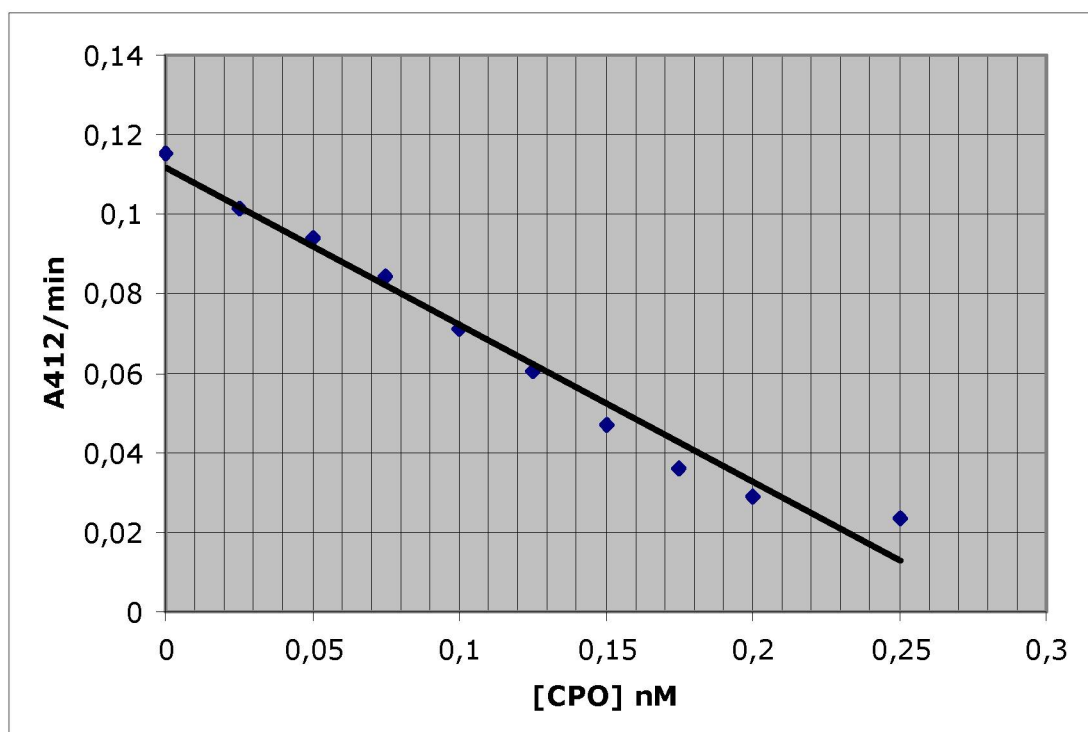


Figura 24. Gráfico obtido a partir da Tabela 29 para a determinação do ponto de inibição total da enzima K12R pelo CPO.

Tabela 30. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima G75R, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).

$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Concentração de CPO (nM)
0,0666	0
0,0579	0,025
0,0519	0,05
0,0456	0,075
0,0399	0,1
0,0387	0,125
0,0322	0,15
0,0262	0,175
0,0215	0,2
0,0158	0,25
0,0123	0,3

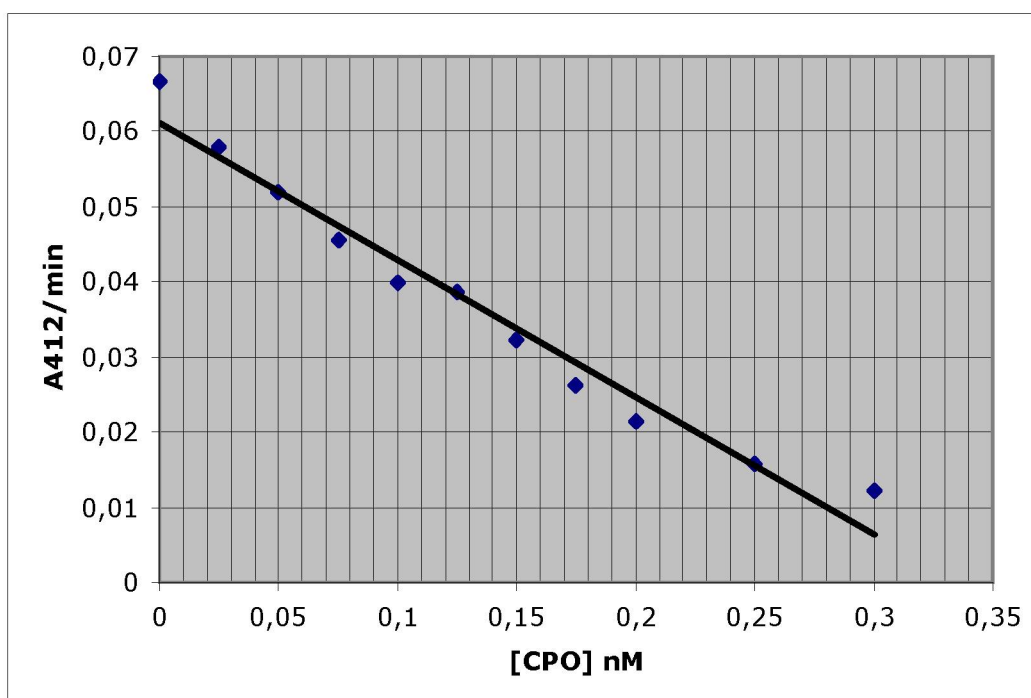


Figura 25. Gráfico obtido a partir da Tabela 30 para a determinação do ponto de inibição total da enzima G75R pelo CPO.

Tabela 31. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima I99M, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).

$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Concentração de CPO (nM)
0,2647	0
0,2185	0,05
0,2075	0,075
0,2014	0,1
0,2009	0,175
0,1798	0,2
0,1301	0,25
0,103	0,3
0,0654	0,35
0,0626	0,4
0,0139	0,5

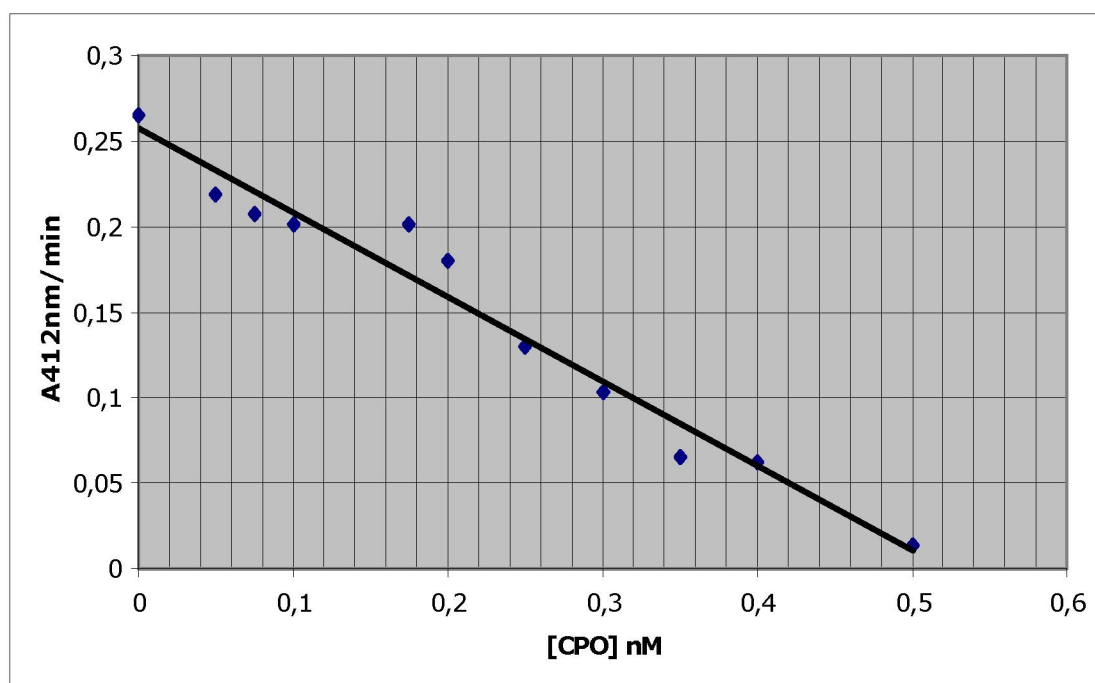


Figura 26. Gráfico obtido a partir da Tabela 31 para a determinação do ponto de inibição total da enzima I99M pelo CPO.

Tabela 32. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima V294M, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).

$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Concentração de CPO (nM)
0,0567	0
0,044	0,025
0,039	0,05
0,0281	0,075
0,0221	0,1
0,0175	0,125
0,0112	0,15
0,0109	0,175

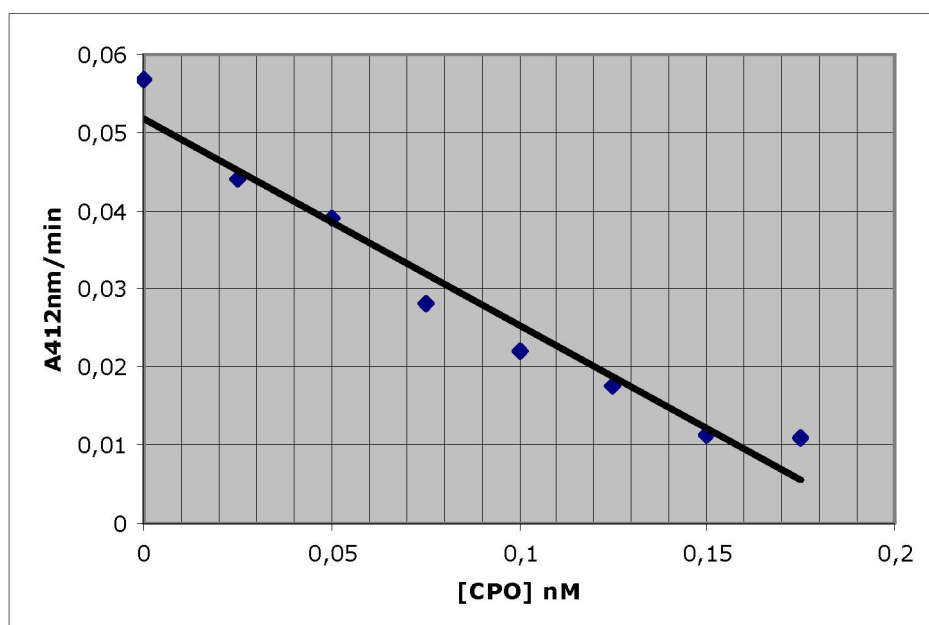


Figura 27. Gráfico obtido a partir da Tabela 32 para a determinação do ponto de inibição total da enzima V294M pelo CPO.

Tabela 33. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima G333C, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).

$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Concentração de CPO (nM)
0,0036	0,012
0,0034	0,024
0,0027	0,036
0,0024	0,042
0,0023	0,048
0,0022	0,06
0,0018	0,072
0,0014	0,084
0,0005	0,108

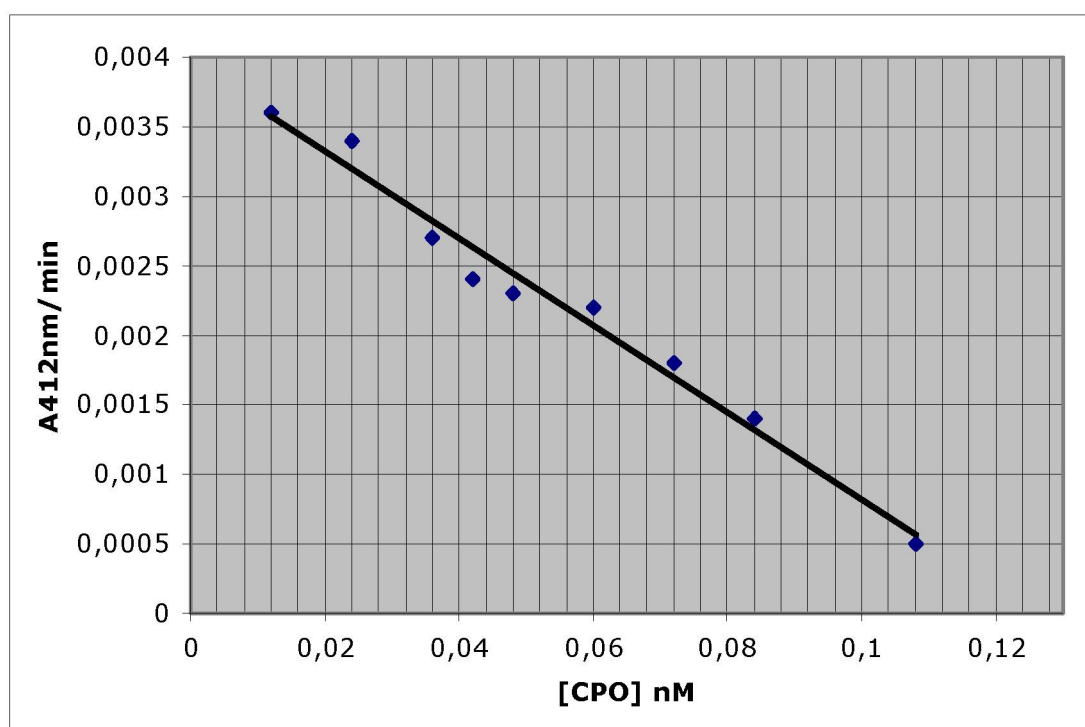


Figura 28. Gráfico obtido a partir da Tabela 33 para a determinação do ponto de inibição total da enzima G333C pelo CPO.

Tabela 34. Valores da variação na absorbância ($\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$) para a enzima R470W, com as respectivas concentrações de inibidor (CPO).

$\Delta A_{412 \text{ nm/min}}$	Concentração de CPO (nM)
0,1552	0
0,141	0,05
0,1151	0,1
0,0832	0,175
0,076	0,2
0,0578	0,25
0,0222	0,35
0,0104	0,4
0,003	0,5

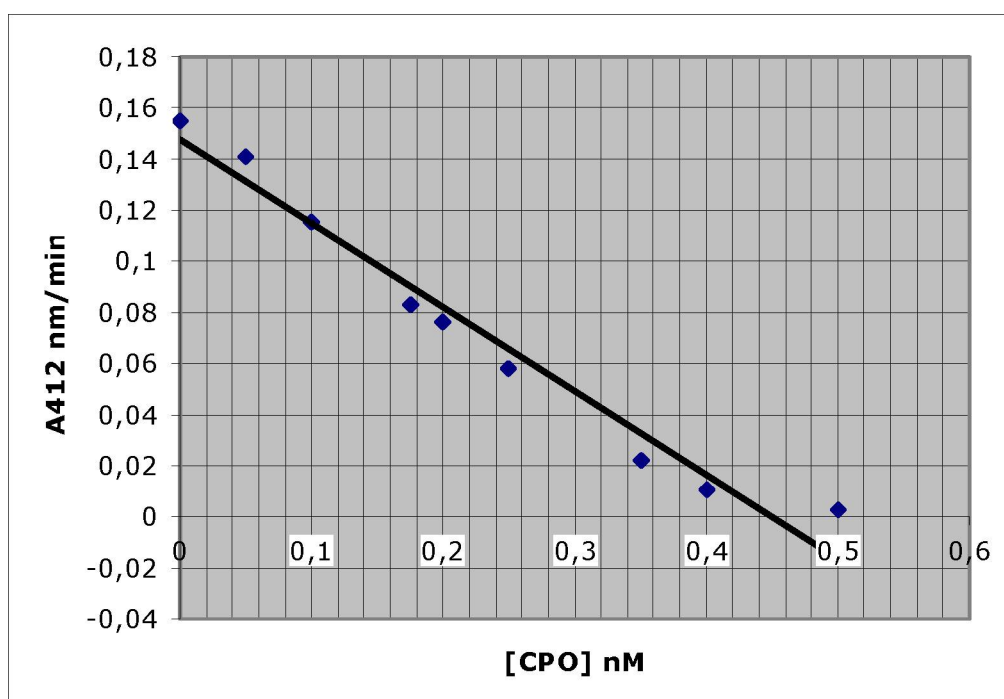


Figura 29. Gráfico obtido a partir da Tabela 34 para a determinação do ponto de inibição total da enzima R470W pelo CPO.

Tabela 35. Valores das concentrações das enzimas variantes expressos em moles/L.

Variante	[BChE] (moles/L)
<i>K12R</i>	$1,24 \times 10^{-8}$
<i>G75R</i>	$1,40 \times 10^{-8}$
<i>I99M</i>	$2,33 \times 10^{-8}$
<i>V294M</i>	$8,5 \times 10^{-9}$
<i>G333C</i>	$5,43 \times 10^{-9}$
<i>R470W</i>	$1,94 \times 10^{-8}$
Tipo usual	$1,32 \times 10^{-8}$

Tabela 36. Valores de k_{cat} , expressos em min^{-1} para as variantes descritas no presente trabalho e para a enzima usual.

Enzima	$k_{cat} (\text{min}^{-1})$
Usual	30000
K12R	35085
G75R	13580
I99M	27382
V294M	20320
G333C	5935
R470W	29428

5.5.4. *Western blot* para a enzima E90D

Devido à enzima E90D não apresentar atividade enzimática, para testar se a enzima estava sendo sintetizada pelas células, foram realizados experimentos de *Western blot* com meio de cultura proveniente de células 293T e usando as próprias células CHO.

Apenas o *Western blot* realizado com as células CHO mostrou a presença da proteína, confirmando que a mesma estava sendo sintetizada, porém não estava sendo secretada da célula. As Figuras 30 e 31 mostram *Western blot* realizado com meio de cultura e com células CHO. Na Figura 31, o rastro observado (B-F) é devido à heterogeneidade na estrutura dos carboidratos presentes na BChE recombinante. A banda uniforme observada em G-I reflete a maior uniformidade das estruturas de carboidratos da BChE nativa, produzida no fígado humano.

5.5.5. Estrutura terciária da BChE

Com base nas substituições de aminoácidos encontradas, o programa Sbyl informou que todas as mutações expressas encontram-se na superfície da estrutura protéica da BChE e distantes do sítio ativo.

Apenas no caso da enzima variante E90D pôde-se inferir alteração na estrutura terciária da BChE. A Figura 32 mostra a estrutura química do aspartato e do glutamato, evidenciando que o radical do glutamato apresenta uma cadeia mais longa que o radical do aspartato. Assim, pode-se inferir possível impedimento na formação da ponte salina, no caso dessa enzima mutante, entre D90 e R42 na estrutura terciária

A Figura 33 ilustra a estrutura terciária da BChE da variante K12R, destacando os outros aminoácidos que foram alterados, individualmente, em cada uma das outras seis mutações encontradas.

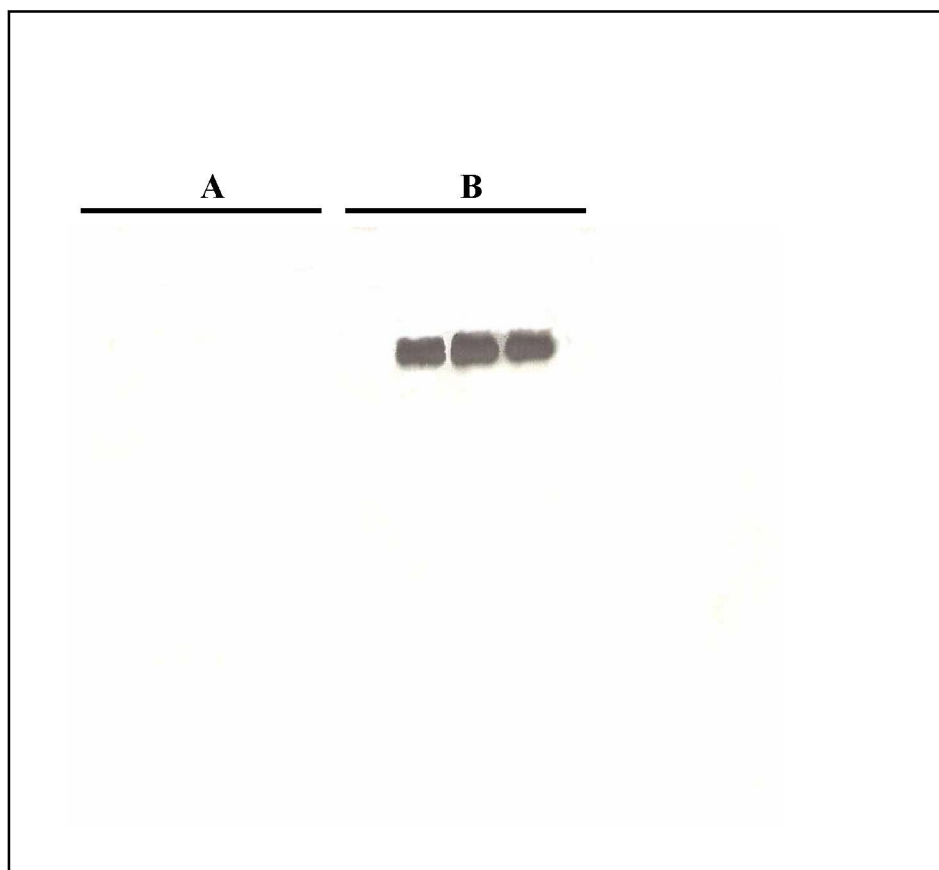


Figura 30. Resultado de *Western blot* da enzima E90D. A) Meio de cultura das células 293T transfectadas com o vetor contendo a mutação *E90D*, sem expressão da BChE. B) BChE purificada a partir de plasma, em triplicata. As bandas indicam a presença da enzima.

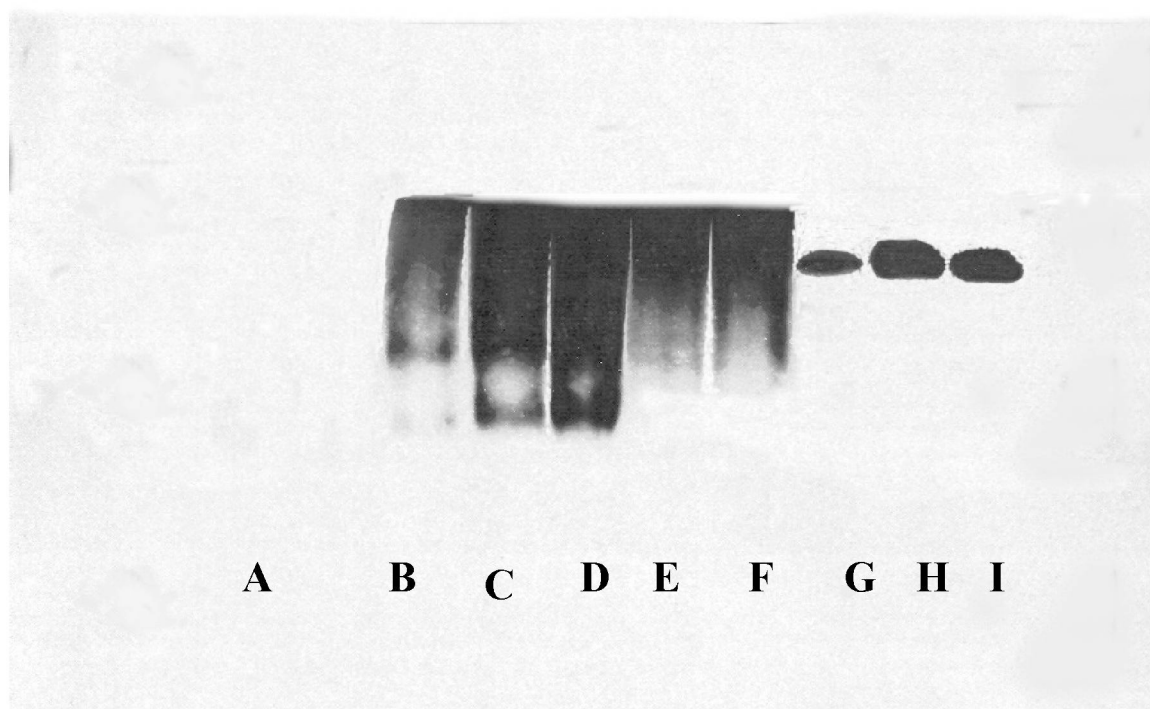


Figura 31. *Western blot* da enzima E90D. A) Lisado de células CHO sem plasmídeo (controle negativo); B) Lisado de células CHO com plasmídeo contendo a mutação *E90D* (25 μ g de proteína); C) Lisado de células CHO com plasmídeo contendo a mutação *E90D* (50 μ g de proteína); D) Lisado de células CHO com plasmídeo contendo a mutação *E90D* (100 μ g de proteína); E) Lisado de células CHO com plasmídeo contendo a mutação *G75R* (controle positivo – 25 μ g de proteína); F) Lisado de células CHO com plasmídeo contendo a mutação *G75R* (controle positivo – 50 μ g de proteína) e G-I) BChE purificada de plasma humano.

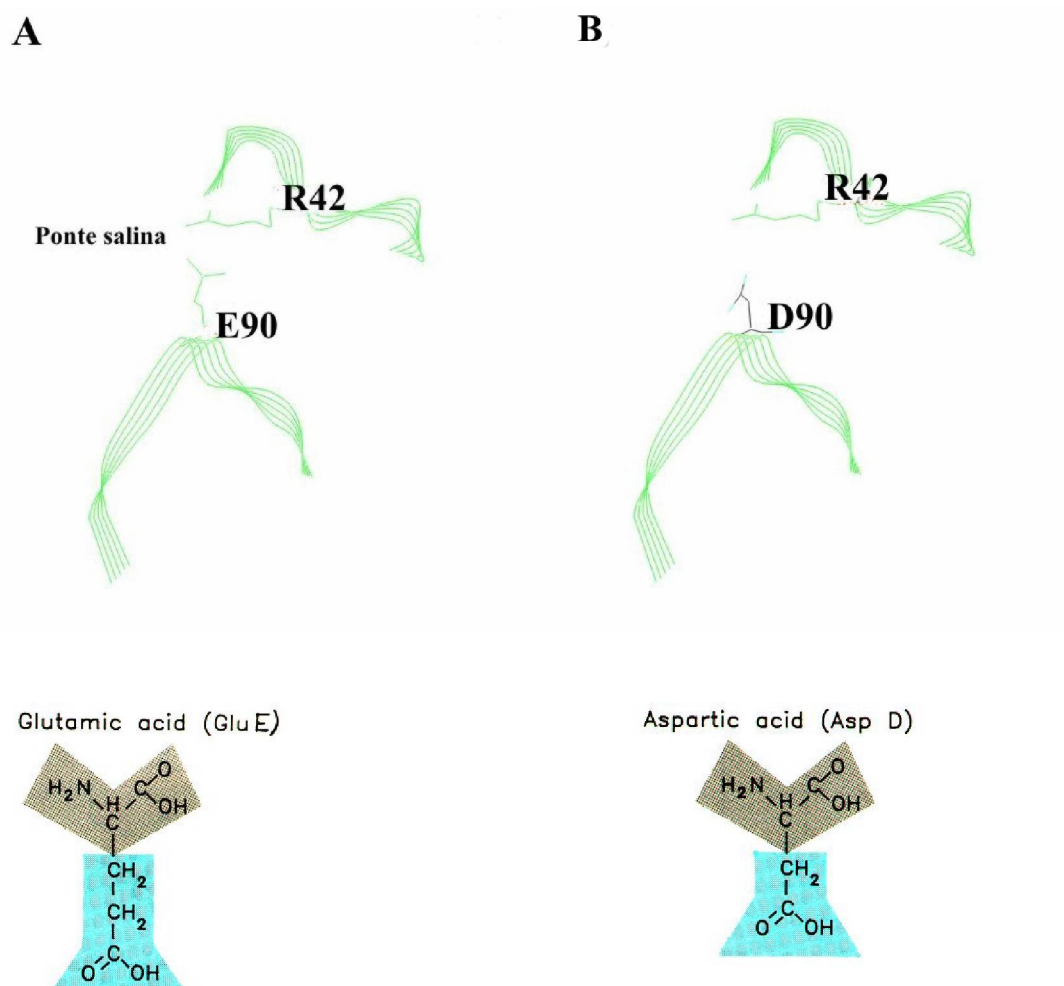


Figura 32. Vistas parciais da estrutura terciária da enzima butirilcolinesterase. A) Resíduos de glutamato 90 (E90), com respectiva estrutura química, e de arginina 42 (R42), presentes na enzima usual, mostrando a ponte salina formada entre eles. B) Resíduos de aspartato 90 (D90), com respectiva estrutura química, e de arginina 42 (R42), presentes na enzima variante E90D, mostrando que a substituição de E → D impede a formação da ponte salina na proteína com a mutação *E90D*.

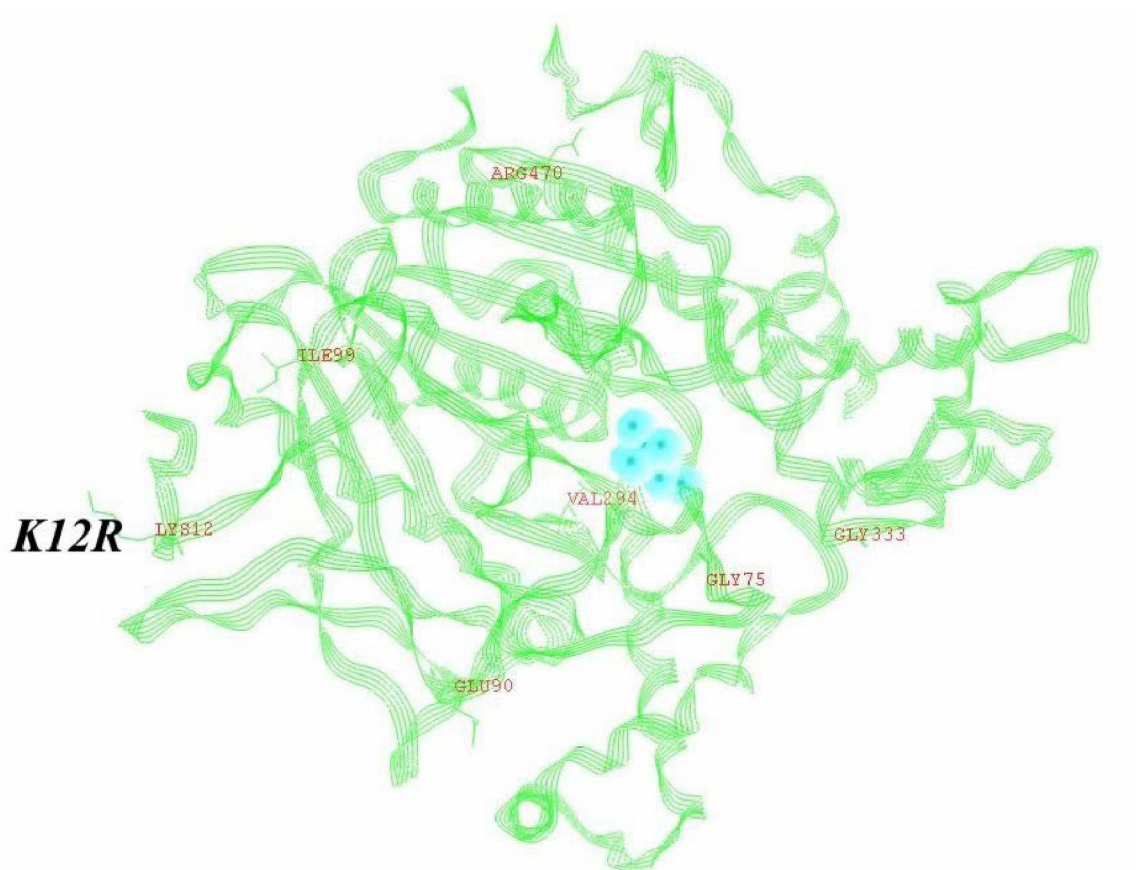


Figura 33. Modelo da estrutura terciária da enzima butirilcolinesterase humana com a mutação *K12R*. As esferas em vermelho representam o sítio ativo da BChE. A posição onde ocorreu a troca do aminoácido está destacada (Lys12). Os aminoácidos que foram modificados nos outros mutantes também estão indicados.

6. DISCUSSÃO

6.1. Metodologia de seleção das amostras para detecção de variabilidade

Ao se fazer a seleção por idade, sexo, grupo étnico, IMC e fenótipos do loco *CHE2*, tentou-se excluir fatores que pudessem influenciar na atividade da enzima, priorizando o efeito das variações genéticas da BChE sobre a atividade. Em relação às variáveis sexo, idade, IMC e tempo de estocagem, observou-se que apenas esta última exerce algum efeito sobre a atividade da BChE na amostra estudada ($b = -0,02$; Tabela 12). Com relação ao tempo de estocagem, a Tabela 11 mostra maior tempo médio no grupo de atividade baixa (66,5 meses) quando comparado com os de atividade média (61,9 meses) e alta (61,4 meses). Entretanto, a diferença foi de apenas cerca de 5 meses nessas médias.

ALCÂNTARA (2000) relatou diferença significativa na atividade da BChE, no fenótipo *CHE2* C5–, com relação ao tempo de estocagem. Na amostra de coleta antiga, a média da atividade da BChE mostrou-se 6,2% menor do que a respectiva média da amostra recente. A estocagem, de cerca de 6 anos, seria responsável por uma queda de 29% na atividade média, no trabalho de ALCÂNTARA (2000).

No presente trabalho, observou-se que o tempo de estocagem é o responsável por uma queda de aproximadamente 0,02 KU/L na atividade, por mês. Assim, o grupo de atividade baixa teria apenas cerca de 2,2% a menos de atividade que os demais grupos, devido ao fator tempo de estocagem, considerando-se os 5 meses a mais de estocagem e a atividade média da amostra total de 4,60 KU/L (Tabela 10).

Quando se comparam as médias de atividade (Tabela 10), em KU/L, da BChE dos grupos de atividade baixa ($3,33 \pm 0,05$), média ($4,65 \pm 0,01$) e alta ($5,83 \pm 0,05$), verifica-se que a atividade, no grupo de atividade baixa, representa 72% daquela do grupo de atividade média e 57% daquela do grupo de atividade alta. Do percentual de diferença do grupo de atividade baixa, 2,2% é devido ao tempo de estocagem, sendo os demais percentuais de diferença devidos a outros fatores. Assim, se algumas amostras foram classificadas como de atividade baixa apenas devido à estocagem, o número delas deve ser muito pequeno.

Como não existe diferença no tempo de estocagem entre os grupos de atividade média e alta (Tabela 11), a diminuição de 20% na atividade da enzima, no grupo de atividade média, é devida apenas a outros fatores.

SOUZA (2001) rastreou uma amostra de 3001 doadores de sangue de Curitiba, pelo método de inibição enzimática, à procura de mutações novas no gene *BCHE*, e para verificar as frequências das mutações na população. O método de inibição enzimática usado se baseia na percentagem de inibição da atividade da BChE na presença de dois inibidores: o Ro2-0683 e o DL-propranolol. Em sua amostra de 3001 indivíduos, foram encontradas 179 variantes não usuais pelo teste de inibição enzimática. Cerca de 85% das amostras que apresentaram fenótipo não usual tiveram o DNA analisado para alguns segmentos do gene *BCHE*. Em comparação com o critério de seleção utilizado por SOUZA (2001), o critério utilizado no presente trabalho (exclusão das variáveis com influência sobre a atividade) utilizou menor número de amostras no início (645), sendo que 370 foram analisadas quanto ao DNA. Consideramos que, com a presente metodologia de seleção, o trabalho se torna mais rápido. Mesmo utilizando menor número inicial de amostras, este estudo conseguiu detectar 12 variações diferentes e um total de 127 indivíduos com variações não usuais no gene *BCHE* (Tabela 20).

O estudo de SOUZA (2001) é o primeiro estudo, em nosso laboratório, a empregar a técnica de SSCA para procurar mutações novas no gene *BCHE*. Para a identificação das mutações, o autor utilizou, algumas vezes, enzima de restrição para clivagem dos fragmentos longos de DNA, após a amplificação por PCR. Mesmo assim, alguns fragmentos usados em SSCA foram relativamente grandes (549 pb, 476 pb, 403 pb) e isso pode ter dificultado a identificação de alguma mutação, uma vez que há relatos na literatura sobre uma perda da sensibilidade da técnica de PCR-SSCA em fragmentos maiores (acima de 300 pb; LESSA e APPLEBAUM, 1993; SHEFFIELD et al., 1993). SOUZA (2001) considerou os fragmentos entre 200 e 300 pb como de tamanho ideal, pois com esses foram obtidos bons resultados. No presente estudo, partindo-se destes dados, trabalhou-se com tamanhos de fragmentos que não excederam 270 pb.

Uma comparação precisa entre os dois trabalhos, visando saber qual a melhor metodologia, de seleção de amostras, para encontrar variação nova no gene *BCHE*, não é possível, uma vez que SOUZA (2001) não analisou todos os segmentos do exon 2, estudados na presente tese, na qual o exon 2 foi dividido em 8 fragmentos. Entretanto, pode-se constatar que a metodologia empregada por ele foi muito mais trabalhosa (partiu-se de uma amostra de 3001 indivíduos) e o número de mutações novas encontradas (4) foi similar ao encontrado nesse estudo (5), que partiu de uma amostra de 645 indivíduos. Nesse sentido, a metodologia aqui empregada mostra-se mais eficaz para a procura de variabilidade genética da BChE.

NEITLICH (1966) relata um indivíduo com atividade da BChE três vezes maior do que a do fenótipo usual, também verificada em consangüíneos do probando. O autor sugere que a atividade aumentada da BChE, neste indivíduo, esteja relacionada a uma alteração molecular, que resultou em uma enzima mais efetiva. YOSHIDA e MOTULSKY (1969) reexaminaram o mesmo caso e verificaram um maior número de moléculas circulantes dessa enzima, à qual foi dado o nome de *Cynthiana*. Essa variação da BChE e o fenótipo CHE2 C5+ são os únicos descritos que levam a aumento na atividade da enzima. Em razão deste relato, considerou-se interessante, no presente estudo, analisar indivíduos com atividade alta da BChE a fim de procurar por mutações novas, que condicionassem uma atividade aumentada da enzima. Isso seria mais fácil de ser observado em nossa amostra, uma vez que não trabalhamos com o fenótipo CHE2 C5+, que apresenta uma atividade maior quando comparado ao fenótipo CHE C5-. Entretanto, nenhuma variação nova foi encontrada nesse grupo de atividade e, em vista disso, concluiu-se que a seleção de indivíduos com atividade alta da BChE no plasma não é interessante para a procura de mutações novas.

A técnica de SSCA fundamenta-se no movimento eletroforético de um fragmento de DNA, em gel de poliacrilamida, que depende da carga elétrica, tamanho do fragmento e estrutura conformacional. Moléculas diferindo em apenas uma única base podem apresentar conformações diferentes e então, podem migrar diferentemente em um sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (GOODALL et al., 2004). Mesmo considerando que a técnica de SSCA é uma metodologia com a qual se pode ter deixado de detectar algumas mutações, não se poderia justificar a ausência de

variação no grupo de atividade alta apenas por causa dessa técnica. Pode-se concluir que variações condicionantes de aumento de atividade da BChE devem ser extremamente raras, e a variação Cynthiana deve ser do tipo privado. Além disso, não está elucidado se a variante Cynthiana decorre de mutação do gene *BCHE* ou do gene *CHE2*.

MAEKAWA et al. (1997) identificaram 12 tipos de mutações diferentes do gene *BCHE*, em indivíduos com atividade enzimática baixa. Os autores verificaram que todos os indivíduos que apresentaram atividade da BChE próxima a zero eram homozigotos para alelos silenciosos e que 58% dos indivíduos com atividade enzimática ligeiramente reduzida eram heterozigotos para os mesmos alelos. Além disso, 43,5% dos indivíduos heterozigotos para alelos silenciosos apresentaram atividade enzimática baixa. Das 12 mutações diferentes, encontradas nos trabalhos desses autores, 5 eram mutações novas no gene *BCHE*.

Em nosso trabalho, também foi verificada, no grupo de atividade baixa, uma alta frequência de indivíduos com variantes não usuais da BChE no exon 2 (27/34; 79%) e de variantes novas (3/5; 67%), em relação ao total dos três grupos de atividade. Como em duas amostras (659 e 1035) com atividade muito baixa da BChE (abaixo de 2 KU/L), não se verificou nenhuma mutação nesse gene, sugere-se que seja efetuada uma análise do exon 3 e da região reguladora, em pesquisa futura.

PRIMO-PARMO et al. (1996), ao analisarem o DNA de 17 indivíduos, não aparentados, com sensibilidade aumentada à succinilcolina, encontraram 12 alelos silenciosos no gene *BCHE*. Isso mostra que o fenótipo silencioso apresenta uma alta heterogeneidade genética.

Portanto, levando-se em consideração dados publicados na literatura e do presente trabalho, sugere-se que em estudos sobre rastreamento de variantes no gene *BCHE* e, principalmente de variantes novas, a seleção de amostras se concentrem em indivíduos que apresentam atividade da BChE baixa, podendo-se ampliar a faixa de atividade baixa além de 4,0 KU/L, até o valor da mediana.

6.2. Variabilidade genética

6.2.1. Dados gerais

Nas 8 regiões do exon 2 analisadas foram encontradas 34 variações (Tabela 20), sendo que em cada fragmento analisado quanto ao DNA, encontrou-se, no mínimo, um tipo de mutação (Tabela 20). O maior número de variantes diferentes, por segmento, foi 2 e os fragmentos que os apresentaram foram os seguintes: nt –42 a 204 (variantes *K12R* e *G15G*), nt 659 a 876 (variantes *T243M* e *E255D*) e nt 835 a 1059 variantes *V294M* e *G333C*).

A Tabela 37 registra o número de mutações encontradas no presente e em outros trabalhos, classificadas por segmento de DNA. Quando se analisam as variantes já descritas (Tabela 1), observa-se, na Tabela 37, que os fragmentos com maior variabilidade genética são os seguintes: nt 1194 a 29 (intron 2), nt 155 a 347, nt 304 a 535 e nt 481 a 719, com 9, 8, 7 e 7 variantes diferentes, respectivamente. Pode-se observar que as 5 mutações novas do presente trabalho representam 25%, 40% e 10% das mutações encontradas nos respectivos fragmentos e 9,1% do total de mutações descritas.

A partir da Tabela 37, foi feita uma análise da distribuição das variantes por fragmento do exon 2. A comparação foi feita através do teste do χ^2 , considerando-se o número total de mutações observadas e esperadas por fragmento. O número esperado foi obtido dividindo-se o tamanho do fragmento, sem o iniciador, pelo tamanho total dos fragmentos (1568 nt) e multiplicando-se pelo número total de variantes encontradas (55). Como há imbricamento dos fragmentos estudados, fez-se a contagem da variação, que aparecia em 2 fragmentos, apenas naquele em que ela ficava mais distante do iniciador. Verificou-se que a distribuição das variantes segue um padrão aleatório ($\chi^2_{(7)} = 2,81$; $P > 0,90$). Portanto, parece não haver nenhuma tendência das mutações já descritas, incluindo as do presente trabalho, de se concentrarem em determinada região do exon 2 do gene *BCHE*, constituindo um “hot spot” mutacional.

Quando se analisa a variabilidade genética das regiões codificadoras dos exons 2 (1433 nt) e 4 (122 nt), encontram-se as frequências de $3,84\% \pm 0,51\%$ e de $0,82\% \pm 0,82\%$ de variantes por nucleotídeo, respectivamente. Comparando-se a distribuição da

Tabela 37. Número de variantes diferentes do gene *BCHE* já descritas por outros autores e as encontradas no presente trabalho, dentro de cada fragmento analisado.

Tamanho do fragmento (nt) ¹	Fragmento (nt)	Número de variantes			Mutações diferentes	
		Outros trabalhos	Presente trabalho		(Total)	
			Descritas	Novas	Observado	Esperado
EXON 2						
206	-42 a 204	6	0	2	8	7,23
160	155 a 347	8	1	0	8	5,61
192	304 a 535	7	1	0	7	6,73
215	481 a 719	7	1	0	7	7,54
180	659 a 876	5	2	0	5	6,31
185	835 a 1059	3	0	2	5	6,49
200	1000 a 1235	5	1	0	5	7,02
230	1194 a 29	9	0	1	10	8,07
	(intron 2)					
1568		50	6	5	55	55,00
EXON 4						
148	-31 (intron 3)	1	1	0		
	a 1758					
Total		51	7	5		

¹ Sem os iniciadores.

variação, por nucleotídeo, nessas duas regiões (55/1433 e 1/122), não se encontra diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 2,15$; $P > 0,10$, com correção de Yates). É possível que essa diferença venha a se tornar significativa, com o aumento de mutações novas a serem descritas. Entretanto, deve haver uma distorção na maioria das pesquisas, feitas até o momento, no sentido de encontrarem mutações preferencialmente no exon 2, no qual se encontra o sítio ativo, uma vez que as amostras, nas quais se procuraram mutações, apresentavam geralmente fenótipos não usuais da BChE.

HASIN et al. (2004), examinando a região codificadora do gene *ACHE* em indivíduos não aparentados de quatro grupos étnicos (48 americanos africanos, 48 judeus ashkenazim, 48 judeus sefaradim e 48 árabes israelenses), encontraram 13 SNPs, dos quais três já haviam sido descritos (BARTELS et al., 1993). Considerando os 13 SNPs, seis estão no exon 2 (quatro resultam em substituição de aminoácido), um no intron 2, um sinônimo no exon 3, um não sinônimo no exon 5, e quatro na região 3' não traduzida. Um total de 11 desses SNPs puderam ser examinados quanto à frequência, que variou de 1% a 39,5%, sendo 4 não sinônimos na região codificadora examinada de 1614 nucleotídeos, correspondendo a 1 SNP a cada 400 nucleotídeos (0,25%).

No caso do gene *BCHE*, foram encontrados 3 SNPs não sinônimos, com frequência $\geq 1\%$ (*D70G*, *E255D* e *A539T*), correspondendo a 1 SNP por 570 nucleotídeos, considerando-se a região codificadora de 1722 nucleotídeos (0,17%).

Com base nessas informações, pode-se concluir que os genes *BCHE* e *ACHE* apresentam frequência semelhante de SNPs não sinônimos na região codificadora, por nucleotídeo.

6.2.2. Variações do gene *BCHE*

Não há relatos de estudos semelhantes ao do presente trabalho, em que se escolha uma amostra populacional e se faça um rastreamento de mutações, utilizando-se a técnica de SSCA. LANDO et al. (2003) procuraram por mutações no gene *BCHE* em doadores de sangue da população italiana, porém não utilizaram PCR-SSCA. A procura por variantes foi feita através de PCR-RFLP para mutações conhecidas, como

a mutação *D70G*, *A539T*, *T243M* e *G390V* e, assim, mutações novas não foram detectadas no estudo desses autores.

São poucos os dados sobre frequências populacionais das variações do gene *BCHE* detectadas ao nível do DNA. Em vista disso, pretendemos enfocar esse assunto, comparando as frequências encontradas no presente trabalho com as de outros estudos.

O método de seleção de amostras que foi utilizado, excluindo as amostras com atividade enzimática nos intervalos de $>4,0$ KU/L a $<4,4$ KU/L e de $>4,9$ KU/L a $<5,3$ KU/L, pode levar a uma frequência mais alta para determinada variante, do que seria esperado se a amostra total tivesse sido examinada. Em relação a este fato, tiraram-se as seguintes conclusões:

- 1) Não haverá distorção na estimativa da frequência da variante:
 - a) se ela se distribuir independentemente da atividade enzimática;
 - b) se for distribuída em todas as 3 classes de atividade enzimática, de acordo com sua correlação com a atividade.
- 2) As variantes que não ocorrerem nas 3 classes de atividade e que estejam concentradas no grupo de atividade baixa, poderão ter sua frequência superestimada.

6.2.2.1. Nucleotídeos –42 a 204

Nesse fragmento foram encontradas duas mutações novas, uma sinônima (*G15G*) e uma não sinônima (*K12R*)¹. Dessas duas mutações, uma foi encontrada no grupo de atividade baixa (*K12R*) e a outra, no grupo de atividade média (*G15G*). Cada uma das mutações apareceu com uma frequência de $0,14\% \pm 0,13\%$, caracterizando-se como mutações raras.

Antes de *G15G* apenas uma mutação sinônima (*A162A*) havia sido descrita até o momento (Tabela 1), por SOUZA et al. (no prelo) no nucleotídeo 486. A mutação *A162A* também foi encontrada no presente estudo, no mesmo indivíduo previamente estudado. SOUZA et al. (no prelo), considerando os 1722 nucleotídeos da região

¹ A definição de mutação sinônima usada é a que se caracteriza por apresentar um nucleotídeo alterado e, mesmo assim, continuar codificando o mesmo aminoácido. Isso acontece devido à degeneração do código genético. Já a mutação não sinônima, é aquela em que a alteração de um nucleotídeo altera o aminoácido a ser codificado, podendo especificar um aminoácido diferente, mas funcionalmente equivalente, um aminoácido diferente e não funcional ou ainda provocar um sinal de término da cadeia, resultando em uma proteína incompleta e não funcional

codificadora do gene *BCHE*, estimaram o número de sítios sinônimos e não sinônimos, de acordo com NEI e GOJOBORI (1986), como sendo de 380,3 e 1341,7 respectivamente. SOUZA et al. (no prelo) verificaram que a mutação sinônima encontrada por eles, única sinônima no grupo das mutações de ponto (2%), representava significativamente menos (número de mutações sinônimas esperadas = 10,8; $\chi^2_{(1)} = 11,4$; $P < 0,001$) que a frequência esperada de mutações sinônimas (22,1%). Provavelmente, essa diferença encontrada deve-se ao fato dos trabalhos sobre variantes genéticas da BChE se basearem em fenótipo (atividade diminuída, inibição deficiente) e as mutações sinônimas não levarem a alterações no fenótipo, não sendo, portanto identificadas nesses estudos.

6.2.2.2. Nucleotídeos 155 a 347

Apesar de apresentar apenas a mutação *D70G*, esse foi o fragmento com o maior número de casos de variações encontradas (13 amostras). A frequência desta mutação foi de $1,80\% \pm 0,49\%$ (13/722).

As amostras com a variante *D70G*, analisadas no presente estudo, já haviam sido estudadas por SOUZA (2001) por testes de inibição enzimática e por PCR-SSCA. Dos 13 heterozigotos *BCHE*U/BCHE*D70G* do presente estudo, apenas um (amostra 1847) não havia sido detectada por SOUZA (2001). Essa amostra não teve valores de inibição alterados, em relação ao fenótipo usual, quando sua atividade foi examinada na presença dos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683. Essa amostra foi selecionada para ter seu DNA analisado por apresentar atividade da BChE baixa (3,15 KU/L). Portanto, algumas vezes o método de inibição enzimática não é suficiente para a detecção daquelas variantes para as quais é indicado.

A mutação *D70G* foi identificada por MCGUIRE et al. (1989) através de seqüenciamento de clone genômico e seqüenciamento de regiões selecionadas do DNA amplificado por PCR. Os autores relataram que em populações de origem européia o alelo *D70G* tem uma frequência gênica média de 1,70%, com cerca de 3/10.000 indivíduos homozigotos atípicos e existindo aproximadamente 3,30% de europeus heterozigotos para esse alelo.

SOUZA (2001) estimou a frequência dessa mutação em $1,21\% \pm 0,16\%$ (53/4382), nos doadores de sangue de Curitiba. Observa-se que a exclusão dos indivíduos com atividade enzimática nos intervalos de $>4,0$ KU/L a $<4,4$ KU/L e de $>4,9$ KU/L a $<5,3$ KU/L, feita no presente estudo, não teve influência significativa na estimativa da frequência desta mutação ($\chi^2 = 1,74$; $P > 0,10$) nessa amostra. Entretanto, como a mutação *D70G* ocorreu preferencialmente no grupo de atividade baixa (92%), a metodologia de seleção empregada no presente estudo poderia levar a uma distorção no sentido de aumento significativo na estimativa da frequência dessa variante, como de outras que apresentassem esse tipo particular de ocorrência.

FADEL-PICHETH (1991), em estudos de outra amostra da população de doadores de sangue de Curitiba, encontrou uma frequência de $1,11\% \pm 0,17\%$ da variante *D70G* e CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1984) encontraram uma frequência de $1,5\% \pm 0,27\%$ em Euro-brasileiros da população de Curitiba. As frequências obtidas por esses autores, com base em dados de fenótipos obtidos por inibição enzimática, não diferem significativamente da frequência dessa variante, obtida no presente trabalho ($\chi^2 = 2,36$, $P > 0,10$; $\chi^2 = 0,30$, $P > 0,55$, respectivamente).

WHITTAKER (1986) fez uma revisão das frequências das variantes do gene *BCHE*, estimadas por diversos autores, com base em testes de inibição enzimática, em grupos étnicos diferentes. Nessa revisão pode-se verificar que a frequência da variante *D70G* varia, em sua maioria, entre 1% e 2% para os diferentes grupos e etnias analisados.

6.2.2.3 Nucleotídeos 304 a 535

Nesse fragmento, foi encontrada a mutação sinônima (*A162A*), em uma amostra também analisada por SOUZA (2001) e que detectou a mesma mutação (SOUZA et al., no prelo). Porém, em seu trabalho, o autor encontrou essa mutação em um fragmento de 529 pb compreendido entre os nt -22 a 507. Esse indivíduo, além dessa mutação sinônima apresenta, ainda, a mutação *A539T*.

Consideramos que duas das variantes já relatadas nesse segmento, as mutações *G115D* (PRIMO-PARMO et al., 1997) e *V142M* (JENSEN et al., 1992; mutação H)

poderiam ter sido detectadas no presente trabalho. Entretanto, essas duas variantes não foram encontradas.

A mutação *V142M* foi descrita por WHITTAKER e BRITTEN (1987), que a relataram em 2 indivíduos, não aparentados, que apresentaram sensibilidade ao suxametônio. Nesses indivíduos, embora os números de dibucaína e fluoreto fossem sugestivos de um fenótipo homozigoto para a mutação *D70G*, o valor observado com o inibidor Ro2-0683 não era característico desse genótipo. As autoras sugeriram que esta mutação estava associada a uma redução muito drástica na atividade enzimática, tal como aquela encontrada em fenótipos condicionados por genes silenciosos. JENSEN et al. (1992) também detectaram a mutação *V142M*, em duas famílias não relacionadas, na Dinamarca, sugerindo que essa mutação não é privada e se encontra distribuída na população. Esses autores comentam que a identificação da mutação *V142M* tinha sido possível apenas pela análise de genealogias em famílias onde ela segregava com a variante *D70G*. Como essa mutação condiciona uma diminuição de 90% na atividade da BChE (JENSEN et al., 1992) e sua frequência pode ser detectada por suas amostras apresentarem atividade enzimática mais baixa que a média, seria esperado encontrar a mutação *V142M*, no grupo de atividade baixa, estudado no presente trabalho. A não identificação dessa mutação, em nosso trabalho, pode ser devida a uma falha na técnica de detecção por SSCA e pelo fato de não contarmos com um controle que auxiliasse a sua identificação. Até o momento, foram descritas apenas 4 famílias com essa variante (WHITTAKER e BRITTEN, 1987; JENSEN et al., 1992), sugerindo que sua frequência é bastante baixa.

A variante *G115D* foi descrita por PRIMO-PARMO et al. (1997) em 4 indivíduos não aparentados, com sensibilidade à succinilcolina. Foi observado que essa variante apresenta instabilidade sob condições extremas de temperatura, tais como: aquecimento e ciclos de congelamento e descongelamento.

SOUZA (2001), ao analisar o DNA por PCR-SSCA, em um fragmento de 529 pb (nt -22 a 507), encontrou 3 amostras, com padrões eletroforéticos diferentes do usual. Resultados posteriores de seqüenciamento revelaram a presença da mutação *G115D* nessas 3 amostras, sendo que uma delas era também portadora da mutação *D70G* (SOUZA, 2004, comunicação pessoal). Considerando que essas 3 variantes

foram encontradas num total de 222 doadores de sangue, sua frequência está sendo estimada em $0,68\% \pm 0,39\%$. No DNA dos 732 cromossomos examinados no presente trabalho seria esperado encontrar cerca de 5 variantes *G115D*, ou mesmo um número mais elevado, considerando-se que 1/3 da amostra foi selecionado por apresentar atividade baixa da BChE.

Quando esse fragmento foi analisado, não se dispunha de controle com essa variante. No final dessa tese, verificou-se que o controle, com essa mutação, não se diferenciava dos outros genótipos, nas condições da metodologia empregada. Em vista disso, foram realizados experimentos com concentrações de acrilamida diferentes (% de T) e com proporções diferentes de bisacrilamida em relação ao total de acrilamida (% de C) para se tentar a identificação da mutação *G115D*, porém nenhum deles revelou sua presença nem mesmo nos controles.

Uma explicação plausível para esse fato seria a de que, no presente trabalho, foi utilizado um fragmento menor para a identificação dessa variação e que, em fragmentos maiores, poderia ocorrer um dobramento diferencial da fita do DNA, propiciando a detecção da referida mutação. A mutação *G115D* encontra-se muito próxima da região de hibridação de um dos iniciadores, utilizados para a amplificação desse segmento. A mutação está no nt 344 e o iniciador E2N35 hibrida na região entre os nt 304 e 323. Uma sugestão, para os próximos trabalhos, seria utilizar outra combinação de iniciadores, gerando um fragmento menor que o examinado por SOUZA (2001), mas que também contivesse o nt 344 mais distante dos iniciadores.

6.2.2.4. Nucleotídeos 481 a 719

Nesse fragmento, 4 indivíduos apresentaram a mutação *A184V* (SC), 3 deles heterozigotos e um homozigoto. A frequência alélica dessa variante foi de $2,17\% \pm 0,96\%$ no grupo de atividade baixa e no total de alelos da amostra a frequência foi de $0,70\% \pm 0,31\%$.

Essa variante foi descrita por GREENBERG et al. (1995) em uma paciente norte-americana com capacidade diminuída em hidrolisar a succinilcolina, sendo também encontrada em seu pai. Esse parece ser o único relato da ocorrência dessa variante.

A identificação de quatro indivíduos portadores da variante *A184V*, sendo um homozigoto, indica que essa mutação não é do tipo privado e sugere que ela não é de ocorrência extremamente baixa. De todas as variantes não polimórficas, encontradas em nosso trabalho, esta é a variante mais freqüente. Entretanto, esta freqüência (0,70%) pode estar ligeiramente inflada, uma vez que essa variante apareceu apenas no grupo de atividade baixa. Se essas 5 variações fossem as únicas desse tipo, na amostra total de 570 doadores de sangue, sua freqüência seria de $0,44\% \pm 0,19\%$. Esse valor se encontra dentro de 1 erro padrão do valor de $0,70\% \pm 0,31\%$.

GREENBERG et al. (1995) relatam que essa variante apresenta apenas capacidade diminuída para hidrolisar a succinilcolina, tendo habilidade normal na hidrólise de outros substratos e resistência como a usual para os inibidores usados (dibucaina e fluoreto). Entretanto, consideramos que apesar da probanda ter atividade da BChE de 2,1 KU/L dentro da variação normal de 1,7 a 7,4 KU/L do laboratório em questão, essa atividade está próxima do limite mínimo. Essa probanda também possui a mutação *G390V*. No homozigoto do presente trabalho, a atividade foi de 3,47 KU/L.

SOUZA (2001) não encontrou nenhum indivíduo que apresentasse a variante *A184V*, em 214 alelos analisados para o fragmento entre nt 508 e 719, segundo dados apresentados nos Apêndices 9.1 e 9.5 de sua tese. Uma possível explicação para essa ausência da variante *A184V* (esperado = 1,5 alelos variantes) poderia ser que o número de alelos analisados não fosse suficiente para sua ocorrência na amostra examinada por ele.

Como não se tem dados sobre a freqüência da variante *A184V*, o presente trabalho servirá de base para indicar que esta mutação não é de ocorrência privada.

6.2.2.5. Nucleotídeos 659 a 876

Nesse fragmento foram encontrados dois tipos de mutações, a *T243M* (F-1) e a *E255D*, sendo o segundo fragmento com maior número de variações, 9 no total (Tabela 20).

Em um gel de poliacrilamida com T = 10% e C = 2%, foi possível diferenciar essas duas variantes apenas das amostras usuais, não sendo, porém, possível a diferenciação das mesmas. Essa discriminação entre *T243M* e *E255D* só foi possível

quando as amostras foram corridas em gel de poliacrilamida ($T = 11\%$ e $C = 3,4\%$), em eletroforese descontínua. Porém, sugere-se que para o rastreamento dessas variações seja usado um gel semelhante ao primeiro e que, este último gel, seja utilizado apenas para a etapa de diferenciação entre as duas mutações, uma vez que é mais duro, extremamente frágil e difícil de se trabalhar.

As mutações *T243M* e *G390V* foram descritas por NOGUEIRA et al. (1992), que identificaram duas mutações de ponto diferentes, associadas com o fenótipo resistente ao fluoreto, porém, os autores não estimaram a frequência dessas duas mutações. Como não existem, na literatura, trabalhos ao nível de DNA sobre a frequência das mutações *T243M* e *G390V*, os dados do presente trabalho são interessantes, pois indicam que não são mutações do tipo privado.

A frequência da variante *T243M*, no presente trabalho, foi de $0,28\% \pm 0,19\%$, estando concentrada no grupo de atividade baixa. A frequência estimada por SOUZA (2001), em dados de DNA selecionados após inibição enzimática ($4/5462$; $0,07\% \pm 0,03\%$), não diferiu do presente trabalho ($\chi^2 = 1,05$; $P > 0,30$, com correção de Yates). SOUZA (2001) não identificou, por inibição enzimática, um indivíduo portador da mutação *T243M*, encontrado no presente estudo. Esse autor analisou apenas 155 indivíduos para o rastreamento dessa variante, enquanto que no presente trabalho foram analisados 358 indivíduos. Portanto, sugere-se, que, para estimativa de frequência dessa variante, seja utilizada a encontrada em nosso estudo, uma vez que o método de inibição enzimática não parece ser suficiente para detectar todas as variantes *T243M*.

Quando a frequência da variante *E255D* foi calculada, obteve-se um valor de $0,98 \pm 0,37\%$. Quando se observa a Tabela 20, verifica-se que essa variante se distribui nos 3 grupos de atividade enzimática, sugerindo que a mutação não afeta a atividade da BChE. PRIMO-PARMO et al. (1996) sugeriram que essa variante seria rara, uma vez que foi encontrada em um único indivíduo. Porém, quando se verifica a frequência da variante no presente trabalho, observa-se que a mesma não é tão rara, podendo mesmo se constituir num polimorfismo. Esses dados são corroborados por SOUZA (2001), que também encontrou padrão eletroforético diferente do usual e que, mais tarde,

confirmou como sendo a variante *E255D*, após seqüenciamento do DNA (SOUZA, 2004, comunicação pessoal).

Os três doadores de sangue com essa variante, detectados por SOUZA (2001) não estão incluídos no presente trabalho. O autor encontrou essas três variações em heterozigose em 155 indivíduos ($0,97\% \pm 0,56\%$), frequência semelhante a do presente trabalho.

Reunindo-se dados de SOUZA (2001) com os do presente trabalho, e excluindo-se casos de duplicação de amostras, examinaram-se 486 doadores de sangue, nos quais foram encontrados 10 portadores da variante *E255D* (frequência alélica de $1,03\% \pm 0,32\%$).

6.2.2.6. Nucleotídeos 835 a 1059

Foram encontradas, nesse fragmento, duas variantes não descritas (*V294M* e *G333C*), nos grupos de atividade média e baixa, respectivamente. Na análise do DNA por PCR-SSCA elas pareciam ser a mesma mutação. Entretanto, o seqüenciamento revelou duas mutações distintas.

Pelos resultados obtidos, sugere-se que quando se encontrar mais de um caso de um padrão eletroforético supostamente não descrito, em um mesmo segmento, se faça o seqüenciamento de todos os casos. Eletroforeticamente, esses casos podem parecer iguais, porém, podem resultar de mutações em nucleotídeos diferentes. Pelas frequências dessas mutações ($0,14\% \pm 0,14\%$) observa-se que cada uma delas é rara na população.

6.2.2.7. Nucleotídeos 1000 a 1235

Nesse fragmento foi encontrada apenas a variante *G390V* (F-2), com uma frequência de $0,28\% \pm 0,19\%$. Esses mesmos indivíduos já haviam sido identificados por SOUZA (2001), por meio de teste de inibição enzimática, seguido de PCR-SSCA. SOUZA (2001) estimou uma frequência semelhante para este alelo de $0,34\% \pm 0,08\%$ com base em 19/5516 alelos.

Os dados do presente trabalho servem, portanto, para reforçar os resultados obtidos por SOUZA (2001), de que a frequência dessa variante é realmente baixa na população em geral.

6.2.2.8. Nucleotídeos 1194 a 29 (intron 2)

Esse fragmento apresentou apenas uma variante, *R470W*, ainda não descrita na literatura. Foi encontrada no grupo de atividade baixa, porém no seu limite superior (4,00 KU/L). Essa mutação não afeta a atividade da BChE, conforme evidenciado nos experimentos de expressão gênica (Tabela 36).

A frequência dessa mutação foi de $0,14\% \pm 0,14\%$.

6.2.2.9. Exon 4

No exon 4 apenas duas mutações já foram descritas (Tabelas 1 e 37), a mutação *A539T* (variante K) e a mutação *1914*. Esta última mutação encontra-se na parte do exon 4 que não codifica para a BChE. No presente trabalho, examinou-se um fragmento de DNA até o nucleotídeo 1758 do exon 4, identificando-se somente a variante *A539T*. Não foi encontrada nenhuma variação nova no fragmento analisado.

A frequência total dessa variação foi de $17,5\% \pm 1,4\%$, nos 366 doadores de sangue examinados. SOUZA (2001) estudou uma amostra populacional composta por 1888 indivíduos (1796 brancos de origem européia e 92 Afro-brasileiros) e encontrou uma frequência de $17,8\% \pm 0,9\%$ e $13,0\% \pm 3,5\%$, respectivamente, e uma frequência total de $17,5\% \pm 0,9\%$. Essas frequências encontradas para a variante *A539T* no presente trabalho e por SOUZA (2001) não diferiram daquelas previamente obtidas na América do Norte (BARTELS et al., 1992a), Escócia (GAFFNEY e CAMPBELL, 1994), Japão (SHIBUTA et al., 1994; IZUMI et al., 1994) e Dinamarca (JENSEN et al., 1996) por outros autores.

Em relação aos dados obtidos no presente trabalho, observa-se que a exclusão de parte dos indivíduos, com base em sua posição na curva de atividade, não influenciou na frequência do alelo *A539T* da amostra de Euro-brasileiros analisada (366), uma vez que frequência semelhante foi encontrada por SOUZA (2001). Isto pode ser devido ao fato de que a queda da frequência da variante *A539T* é proporcional

à diminuição na atividade enzimática (Tabela 22): baixa ($32,6\% \pm 3,1\%$), média ($12,1\% \pm 2,1\%$) e alta ($8,5\% \pm 1,8\%$).

O alelo *A539T* causa uma redução de 33% no número de moléculas circulantes (RUBINSTEIN et al, 1978), o que explica sua maior frequência no grupo de atividade baixa.

LANDO et al. (2003), ao estudarem 106 indivíduos de uma população não selecionada (controle) e 30 indivíduos com atividade muito baixa da BChE (retirados de uma amostra populacional de 2609), estimaram uma frequência da variante *A539T* de 15% e 70%, respectivamente. Os resultados obtidos por esses autores reforçam os do presente trabalho, onde também se observou uma frequência mais alta dessa variante (32,6%) no grupo de atividade baixa.

6.3. Desequilíbrio de ligação e heterozigosidade

Foi encontrado desequilíbrio de ligação entre as mutações *D70G* e *A539T*, sendo que dos haplótipos com a variante *D70G*, 91,2% apresentam a variante *A539T*. Uma frequência similar foi encontrada por BARTELS et al. (1992a), que verificaram a presença da mutação *A539T* em 89,5% dos cromossomos analisados com a mutação *D70G*.

A mutação *E255D* (nt 765) também mostrou estar em desequilíbrio de ligação com a mutação *A539T* (nt 1615), sendo o valor de $D' = 65,58\%$. PRIMO-PARMO et al. (1996) verificaram a presença desse alelo segregando numa família, porém não foi encontrada a mutação *A539T* nos indivíduos estudados. No presente estudo, a ocorrência da mutação *A539T* em 5 dos 7 indivíduos portadores da mutação *E255D* indicou que estas duas mutações estariam em desequilíbrio de ligação, o que foi confirmado pela análise. O fato de ter sido encontrado desequilíbrio de ligação entre as variações *E255D* e *A539T*, sugere que a variação *E255D* apareceu em um cromossomo que já apresentava a variação *A539T*.

Supondo-se que a taxa de permuta genética seja constante no gene *BCHE*, seria de se esperar que, quando se comparam dois valores de D' , o maior deles deve envolver a mutação de aparecimento mais recente. Portanto, quando se comparam os valores do desequilíbrio de ligação entre os nucleotídeos 209 e 1615, em relação ao

encontrado entre os nucleotídeos 765 e 1615, o menor valor apresentado, neste último, poderia indicar que a variante *E255D* é mais antiga que a variante *D70G*. O fato do nucleotídeo 765 estar mais próximo do nucleotídeo 1615 do que o nucleotídeo 209 ainda reforça mais essa conclusão.

É possível inferir que, se a variante *E255D* for mais antiga do que a *D70G* ela possa estar presente em africanos, uma vez que a mutação *D70G*, mais recente, parece estar presente em africanos como consequência de fluxo gênico (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1984). Para testar a presença de *E255D* nesse grupo étnico, seria interessante um estudo populacional.

Em relação ao grau de heterozigosidade para os exons 2 e 4, observou-se que a maior parte dos heterozigotos estão no exon 4 (26,78%), que conta com apenas 122 nucleotídeos, e 9,16% estão presentes nos 1433 nucleotídeos do exon 2. A maior proporção de heterozigotos (75%), presente no exon 4, deve-se à variante *A539T*, que é a mais freqüente após a usual (cerca de 18%). A variante mais freqüente do exon 2 é a *D70G*, com freqüência de cerca de apenas 2%, em populações de origem européia. Enquanto o exon 2 determina o centro ativo da BChE, o exon 4 parece apenas estar relacionado com a tetramerização da BChE (ALTAMIRANO e LOCKRIDGE, 1999).

FURTADO et al. (2004), considerando apenas as variantes *D70G*, *G390V* e *A539T* na população indígena Guarani do Mato Grosso do Sul, encontraram cerca de 26% de heterozigosidade.

A heterozigosidade no presente estudo (35,93%) seria mais alta se a variante *G115D* (freqüência alélica = 0,68%) tivesse sido encontrada. Mesmo considerando-se que a técnica de SSCA tenha perdido alguma mutação, essa freqüência dificilmente ultrapassaria 40% para a região codificadora do gene *BCHE*.

6.4. Expressão gênica das variantes não descritas anteriormente

Foi feita a expressão gênica das quatro variantes, encontradas no presente trabalho, e 3 do trabalho de tese de SOUZA (2001), confirmadas como sendo mutações novas no gene *BCHE* (SOUZA et al., no prelo). As variantes expressas foram as

seguintes: *K12R*, *G75R*, *E90D*, *I99M*, *V294M*, *G333C* e *R470W*. Das 7 variantes expressas, apenas 1 apresentou fenótipo silencioso (*E90D*).

LOCKRIDGE (1990) foi um dos primeiros trabalhos a descrever o procedimento de expressão gênica da BChE humana em células de mamíferos. Essa autora mostrou que a enzima BChE recombinante do tipo usual tinha especificidades de substrato e inibidor normais, assim como organização tetramérica normal. Muitos outros trabalhos foram publicados, ao nível de expressão gênica, para variantes do gene *BCHE*. PRIMO-PARMO et al. (1996) fizeram a caracterização de 3 variantes silenciosas, por expressão gênica, a fim de avaliarem os efeitos das mudanças de aminoácidos nas proteínas resultantes. MASSON et al. (1997) estudaram os mutantes *D70G*, *D70K* e *A277W* para avaliarem o papel do aspartato 70 e triptofano 277 em reações com organofosforados. LOCKRIDGE et al. (1997) construíram um mutante *G117H* com habilidade em catalisar a hidrólise de ésteres de organofosfatos. LIU et al. (2002) encontraram uma mutação no nucleotídeo 943, com uma inserção de adenina mudando o aminoácido 315 para asparagina e induzindo um códon de terminação no nt 322. Essa mutação causava uma atividade muito baixa da BChE no paciente. Os autores fizeram, então, a expressão gênica dessa mutação e encontraram atividade da BChE 30% menor, quando comparada com o tipo usual.

6.4.1. Variantes com atividade e k_{cat} normais

As variantes *K12R*, *I99M*, *V294M* e *R470W* apresentaram atividade da BChE normal. Isto pode ser verificado na Tabela 26, que mostra os valores de atividade, e na Tabela 27 com os valores de K_m , V_{max} , K_{ss} e b , de todas essas variantes e do genótipo usual.

6.4.1.1. Variante *K12R*

A amostra de plasma com essa variante mostrou atividade da BChE de 3,95 KU/L. Quando se analisou o meio de cultura, no qual as células 293T expressaram a enzima variante *K12R*, obtiveram-se valores de atividade e de cinética enzimática normais.

Quando se faz uma análise comparativa das colinesterases entre diferentes organismos, observa-se que o aminoácido lisina 12, presente na enzima usual, não é conservado entre as espécies. A acetilcolinesterase humana apresenta arginina na posição 12 (NCBI; ENTREZ, 2004- AH005291), assim como as butirilcolinesterases de galinha (NCBI; ENTREZ, 2004 - AJ306928), camundongo (NCBI; ENTREZ, 2004; ENTREZ, 2004 - NM_009738) e rato (NCBI; ENTREZ, 2004 - NM_022942). Portanto, a mudança de lisina para arginina parece não ter efeitos sobre a atividade da BChE.

Como essa variante mostrou parâmetros enzimáticos normais, o fato de ter sido encontrada no grupo de atividade baixa deve ter sido por outra razão (outra mutação, razões ambientais), independente da variante *K12R*.

6.4.1.2. Variante *I99M*

Apesar do portador dessa variante ter apresentado atividade da BChE do plasma bastante baixa (1,32 KU/L; SOUZA, 2001), essa variante não apresentou valores de parâmetros enzimáticos alterados, quando se analisou sua atividade após a expressão gênica.

Portanto, pode-se concluir que a mutação *I99M* não é a responsável pela diminuição da atividade dessa amostra e, provavelmente, outro fator deve estar envolvido. Sugere-se que outras regiões do gene *BCHE* sejam analisadas nesse indivíduo como, por exemplo, a região reguladora à procura de outras mutações que possam estar influenciando sua atividade.

6.4.1.3. Variante *V294M*

Essa variante foi encontrada no grupo de atividade enzimática média, com um valor de atividade, medido do plasma do indivíduo, de 4,51 KU/L. Portanto, não foi de se surpreender que os valores dos parâmetros bioquímicos foram normais em relação à atividade.

6.4.1.4. Variante *R470W*

Essa variante, apesar de ter sido encontrada no grupo considerado de atividade baixa, apresentou valor de atividade da BChE do plasma no limite superior desse grupo (4,00 KU/L). Os valores dos parâmetros bioquímicos medidos, após expressão gênica, encontram-se também dentro do padrão normal para a BChE do tipo usual.

Portanto, pode-se concluir que a mutação *R470W* não é a responsável pela diminuição da atividade da BChE dessa amostra e, provavelmente, outro fator deva estar envolvido.

6.4.2. Variantes com k_{cat} diminuído

6.4.2.1. Variante *G75R*

O doador de sangue portador dessa variante apresentou, além dessa mutação, a mutação *A539T* também em heterozigose. Um plasmídeo contendo apenas a mutação *G75R* foi transfectado para as células 293T.

O valor de aproximadamente 13.500/min, encontrado para o k_{cat} dessa enzima, sugere que a mesma tem atividade mais baixa por mg de BChE do que a enzima usual. Assim, sua atividade representa apenas 45% da atividade da enzima usual (Tabela 36).

Portanto, o baixo valor de atividade (2,12 KU/L; SOUZA, 2001) encontrado no plasma do indivíduo portador dessa mutação pode ser devido a esse fato, bem como à presença da mutação *A539T*, que diminui em 33% a quantidade de moléculas de BChE circulantes.

Quando as seqüências das colinesterases de diferentes organismos são comparadas (NCBI; ENTREZ, 2004), pode ser observado que o aminoácido G75 é conservado entre as espécies, sugerindo que pode ter algum papel importante na função enzimática.

6.4.2.2. Variante *G333C*

Essa variante foi encontrada no grupo de atividade baixa, com um valor de atividade no plasma de 3,09 KU/L. O valor de k_{cat} , para essa enzima, mostrou-se muito baixo (aproximadamente 6.000; Tabela 36), indicando que essa enzima tem capacidade reduzida na transformação de substrato em produto, por causa da sua atividade intrínseca mais baixa.

A atividade mais baixa das enzimas variantes com baixo k_{cat} (G75R e G333C) poderia ser devido à instabilidade. A BChE poderia estar desdobrada em temperatura de 37°C ou uma certa porcentagem da proteína poderia estar dobrada de forma incorreta, ou ainda, a BChE poderia ter uma estabilidade normal, mas a mutação poderia mudar a orientação dos resíduos no sítio ativo. O desalinhamento de um resíduo do sítio ativo em relação ao outro (Ser198, His438, Glu325, sítio de ligação de colina Trp82, “acyl pocket” Leu286 e Val288 e sítio periférico Asp70), poderia reduzir a eficiência catalítica.

6.4.3. Variante silenciosa

No grupo de variantes silenciosas se incluem aquelas que não apresentam atividade da BChE e as que a apresentam com nível inferior a 10% do valor de atividade do tipo usual (PRIMO-PARMO et al., 1996). Nessa categoria de variantes silenciosas está a variante *E90D*.

A variante *E90D* expressa em células 293T e CHO não determinou atividade, sendo caracterizada como uma mutação silenciosa. Para testar se a enzima estava sendo produzida, e não apresentava atividade devido à troca de aminoácido, foi realizado um experimento de *Western blot* para verificar a presença da proteína.

Diferentes alíquotas do mesmo meio de cultura, utilizado para o exame da atividade, foram colocadas em gel de poliacrilamida e submetidas ao protocolo de *Western blot*. Porém, após a revelação da membrana, não se conseguiu visualizar a presença da proteína variante em meio de cultura.

Foi levantada a hipótese de que a quantidade de moléculas circulantes no plasma estaria diminuída e, por isso, não se conseguia visualizar a proteína. Foi feita, então, uma concentração do meio de cultura (em torno de 100X) e, com esse material, novo *Western blot* foi realizado. Também não se visualizou nenhum traço da proteína neste meio de cultura concentrado.

Outra hipótese seria a de que a proteína estaria sendo sintetizada pelas células competentes (293T), porém devido a problema estrutural não estava sendo secretada da célula pelo aparelho de Golgi. Para verificar essa hipótese, foi feita nova transfecção da variante *E90D*, dessa vez em células CHO (transfecção estável) para a posterior realização de *Western blot*. O meio de cultura com as células CHO não mostrou

atividade enzimática, confirmando os resultados anteriormente obtidos com as células 293T.

Utilizando-se, então, o lisado das próprias células no experimento, realizou-se novo *Western blot* e, finalmente, a presença da proteína variante no interior da célula pôde ser detectada com a visualização de um rastro (Figura 31).

Esse rastro é observado em BChEs recombinantes independente do genótipo. Tanto a BChE usual como todos os mutantes, já expressos em células CHO, produzem esse rastro. A explicação para esse rastro decorre da composição de carboidratos da enzima. A BChE humana contém 9 cadeias de carboidratos ligadas a 9 asparaginas, cada uma com uma média de 2 ácidos siálicos, carregados negativamente, na extremidade da cadeia. Entretanto, as cadeias sintetizadas pelas células CHO são mais heterogêneas que aquelas produzidas no fígado humano, quanto à composição de carboidratos, e podem terminar, preferencialmente, em galactose ou manose do que em ácido siálico (LOCKRIDGE, 2005, comunicação pessoal). Em decorrência dessa heterogeneidade de carboidratos, é formado um rastro, após eletroforese, em vez de uma única banda, como acontece com a BChE humana purificada do plasma.

A partir desse último resultado de *Western blot*, concluiu-se que a mutação *E90D* estava condicionando a síntese da enzima e que essa BChE mutante não devia estar sendo reconhecida pelas chaperoninas dentro da célula, devido a problemas conformacionais e, portanto, não estava sendo exportada para fora das células.

CYGLER et al. (1993) relataram, em estudos com AChE de *Torpedo*, que essa enzima apresenta quatro pontes salinas conservadas e que essas pontes têm um importante papel na estabilização dessa enzima, unindo firmemente alças vizinhas. A primeira ponte salina é formada entre a arginina 44 e o glutamato 92, que correspondem às posições arginina 42 e glutamato 90 na BChE humana, respectivamente. Esses autores comentam que quando ocorre uma mudança de glutamato para aspartato, na posição 90, não ocorre a formação dessa ponte (Figura 32), impossibilitando a formação da estrutura conformacional normal da BChE.

Esse fato, relatado por CYGLER et al. (1993), serve de base para explicar porque a enzima variante, descoberta no presente trabalho, não é secretada da célula e, conseqüentemente, não se detecta sua atividade no meio de cultura. Por esse motivo,

não deverá apresentar atividade no plasma. O heterozigoto, detectado por SOUZA (2001), apresentou atividade da BChE bastante baixa (1,51 KU/l). Esse indivíduo também era heterozigoto para a mutação *A539T*.

6.4.4. Aminoácidos determinados pelas mutações novas

GRAUR e LI (2000), ao comentarem sobre os padrões de trocas de aminoácidos durante o processo evolutivo, referem-se à medida de distância físico-química entre eles. Essa distância físico-química é baseada nas seguintes propriedades: polaridade, volume molecular e composição química. Dependendo se o aminoácido é trocado por um similar ou não, respectivamente, as trocas são denominadas conservativas ou radicais. Durante o processo de evolução das proteínas, as trocas conservativas ocorrem mais freqüentemente. Alguns aminoácidos, como cisteína, triptofano, tirosina e glicina, denominados de idiossincráticos, apresentam pouca similaridade com os demais aminoácidos, o que dificulta a troca por aminoácidos similares.

GRANTHAM (1974) estabeleceu as distâncias físico-químicas entre os aminoácidos, variando de 5 a 215. A Tabela 38 mostra essas distâncias físico-químicas entre os aminoácidos trocados, em decorrência das mutações descritas no presente estudo. Pode-se observar que as duas maiores distâncias (125 e 159) se referem às mutações que condicionam redução na atividade catalítica da BChE de cerca de 55% e de 80%, respectivamente. Nos dois casos, o aminoácido da enzima usual era glicina, o menor de todos os aminoácidos. A glicina tende a ser conservada durante a evolução, tendo em vista que sua mudança provoca a entrada de um aminoácido de maior volume. Isso pode acarretar uma mudança estrutural com alta probabilidade de afetar a função da proteína (GRAUR e LI, 2000). Considera-se essa razão como suficiente para explicar a menor atividade intrínseca dessas duas enzimas variantes encontradas.

No caso das demais enzimas variantes, a distância entre os aminoácidos trocados varia de 10 a 101. No caso da enzima R470W (distância = 101), a posição do aminoácido alterado é periférica e distante do sítio ativo da enzima. É possível que seja essa a razão para a falta de alteração na atividade da BChE. Quanto à enzima variante E90D, com distância igual a 45, já foi dada explicação para seu fenótipo silencioso, como decorrente de impossibilidade de formação de ponte salina.

Tabela 38. Distâncias físico-químicas dos aminoácidos alterados nas mutações descritas no presente trabalho.

Mutação	Aminoácidos	Distâncias físico-químicas ¹
<i>K12R</i>	Lys → Arg	26
<i>G75R</i>	Gly → Arg	125
<i>E90D</i>	Glu → Asp	45
<i>I99M</i>	Ile → Met	10
<i>V294M</i>	Val → Met	21
<i>G333C</i>	Gly → Cys	159
<i>R470W</i>	Arg → Trp	101

¹De acordo com GRANTHAM (1974).

7. CONCLUSÕES

7.1. Variabilidade genética

Após investigação dos exons 2 e 4, foram encontradas 12 variações não usuais, sendo 11 no exon 2 (*K12R*, *G15G*, *D70G*, *A162A*, *A184V*, *T243M*, *E255D*, *V294M*, *G333C*, *G390V* e *R470W*) e uma no exon 4 (*A539T*). Vinte doadores de sangue apresentaram, além da variante *A539T*, no exon 4, uma outra variante, no exon 2; 14 apresentaram variações apenas no exon 2 e 93 apresentaram variações apenas no exon 4. No total, foram encontrados 127 indivíduos com variações não usuais.

Cinco das variantes são novas, sendo três no grupo de atividade baixa (*K12R*, *G333C* e *R470W*) e duas no grupo de atividade média (*G15G* e *V294M*).

As frequências encontradas das mutações *D70G* ($1,80\% \pm 0,49\%$), *T243M* ($0,28\% \pm 0,19\%$) e *A539T* ($17,49\% \pm 1,40\%$) não diferiram significativamente de outros estudos. A frequência estimada de $0,28\% \pm 0,19\%$ para a variante *G390V* confirma que essa variante apresenta uma frequência populacional baixa. As frequências das variantes *A184V* e *E255D* foram estimadas, pela primeira vez, como sendo de $0,70\% \pm 0,31\%$ e $0,98\% \pm 0,37\%$. As demais variações apareceram em apenas um heterozigoto, sendo muito raras ($0,14\% \pm 0,14\%$).

Foi desenvolvido um protocolo de SSCA para a diferenciação das variantes *T243M* e *E255D*, anteriormente conseguido em nosso laboratório somente por RFLP.

Foi detectado desequilíbrio de ligação entre as variantes *E255D* (nt 765) e *A539T* (nt 1615), com valor de $D' = 65\%$.

7.2. Expressão gênica

Das 7 variantes novas: 4 do presente trabalho (*K12R*, *V294M*, *G333C* e *R470W*) e 3 (*G75R*, *E90D* e *I99M*) do trabalho de SOUZA et al.(no prelo), submetidas ao protocolo de expressão gênica, apenas uma (*E90D*) condicionou fenótipo silencioso e duas (*G75R* e *G333C*) determinaram atividade diminuída da BChE, representando cerca de 45% e 20% daquela da enzima usual, respectivamente. A enzima silenciosa *E90D* não apresentou nenhum traço de atividade enzimática, mostrando uma alteração

estrutural, que impede sua liberação da célula.

O programa computacional Sybil, que representa graficamente a estrutura terciária da BChE, não mostrou alterações significativas, no caso das enzimas variantes novas, uma vez que os aminoácidos alterados encontram-se na superfície da enzima e distantes do centro ativo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PICHETH, G.; VIEIRA, M.M. A method for serum cholinesterase phenotyping. **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 4, p.841-846, 1991.
- ALCÂNTARA, V.M.; CIPRIANI, T.R.; REA, R.; SUPLICY, H.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 22, p. 213, 1999. Suplemento.
- ALCÂNTARA, V.M. **Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR.** Curitiba, 2000. 230f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- ALLES, G.A.; HAWES, R.C. Cholinesterases in the blood of man. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 133, p.375-390, 1940.
- ALLDERDICE, P.W.; GARDNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N.; McALPINE, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, Amsterdam, v. 11, p. 452-454, 1991.
- ALTAMIRANO, C.V.; LOCKRIDGE, O. Conserved aromatic residues of the C-terminus of human butyrylcholinesterase mediate the association of tetramers. **Biochem.**, London, v. 38, 13414-13422, 1999.
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochem.**, London, v. 29, p. 124-131, 1990.
- ARPAGAU, M.; FEDON, Y.; COUSIN, X.; CHATONNET, A.; BERGE, J.B.; FOURNIER, D.; TOUTANT, J.P. cDNA sequence, gene structure, and in-vitro expression of *ace-1*, the gene encoding acetylcholinesterase of class-a in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, p. 9957-9965, 1994.
- AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: KOELLE, G.B. (org). **Handbook of experimental pharmacology**. New York: Springer-Verlab, p. 89-128, 1963.
- BALASUBRAMANIAN, A.S.; BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **FASEB J.**, Bethesda, v. 7, p. 1354-1358, 1993.
- BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1104-1114, 1992a.

BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1086-10103, 1992b.

BARTELS, C.F.; ZELINSKI, T.; LOCKRIDGE, O. Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (ACHE) gene accounts for YT blood group polymorphism. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 52, p. 928-936, 1993.

BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A.M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by right-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, Berlin, v.48, p. 137-144, 1991.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. PRIMO-PARMO, S.L.; LOURENÇO, M.A.C.; CULPI, L. Frequencies of atypical serum cholinesterase among Caucasians and Negroes from Southern Brazil. **Hum. Hered.**, New York, v. 34, p. 388-392, 1984.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Relação entre os fenótipos do loco *CHE2* da colinesterase do soro e o peso individual em duas amostras dos sul do Brasil.** Curitiba. 1989. f. 125. Tese (professor titular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M.A.C.; VIEIRA, M.M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, New York, v. 41, p. 330-339, 1991.

CROOK, M.; HAQ, M.; TUTT, P. Serum lipids, acute phase proteins and serum cholinesterase in normal subjects. **Scand. J. Lab. Invest.**, Oslo, v. 54, p. 601-603, 1994.

CYGLER, M.; SCHRAG, J.D.; SUSSMAN, J.L.; HAREL, M. SILMAN, I.; GENTRY, M.K.; DOCTOR, B.P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. **Protein Sci.**, New York, v. 2, p. 366-382, 1993.

DEN DUNNNEN, J.T.; ANTONARAKIS, S.E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Hum. Mutation**, New York, v. 15 (7-12), 2000.

DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. **Clin. Chem.**, New York, v. 19, p. 1309-1313, 1973.

EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N.; MOHR, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v. 35, p. 313-321, 1989.

ENTREZ search and retrieval system. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>> Acesso em 11 agosto 2004.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmac.**, New York, v. 7, p. 88-95, 1961.

EVANS, R.T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, New York, v. 24, p. 1762-1766, 1978.

FADEL-PICHETH, C. **Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba**. Curitiba, 1991. 107f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FURTADO, L.; SOUZA, R.L.R.; TSUNETO, L.T.; PETZ-ERLER, M.L.; CHAUTARDE-FREIRE-MAIA, E.A. Genetic variability of butyrylcholinesterase in Brazilian Guarani Indians of Mato Grosso do Sul. **Genet. Mol. Biol.**, 2004, enviado para publicação.

GAFFNEY, D.; CAMPBELL, R.A. A PCR method to determine the Kalow allele frequency and its significance in the normal population. **J. Med. Genet.**, London, v. 31, p. 248-250, 1994.

GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, Amsterdam, v. 11, p. 455-458, 1991.

GOODALL, R. Cholinesterase: phenotyping and genotyping. **Ann Clin. Biochem.**, London, v. 41, p. 98-110, 2004.

GRANTHAM, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. **Science**, Washington, v. 185, p. 862-864, 1974.

GRAUR, D.; LI, W-H. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, p. 129-132, 2000.

GREENBERG, C.P.; PRIMO-PARMO, S.L.; PANTUCK, E.J.; LA DU, B.N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. **Anesth. Analg.**, Cleveland, v. 81, p. 419-421, 1995.

HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cyrrhosis. **Intern. Med.**, Tokyo, v. 31, p. 357-362, 1992.

HALL, T.A.. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** v. 41:95-98, 1999.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics.** Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical, 1980.

HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes. **Nature**, London, v. 191, p. 496-498, 1961.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A E ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, London, v. 196, p. 1296-1298, 1962.

HASIN, Y.; AVIDAN, N.; BERCOVICH, D.; KORCZYN, A.; SILMAN, I.; BECKMAN, J.S.; SUSSMAN, J.L. A paradigm for single nucleotide polymorphism analysis: the case of the acetylcholinesterase gene. **Hum. Mut.**, New York, v. 24, p. 408-416, 2004.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S.L.; LA DU, B.N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Rinsho Byori**, Tokyo, v. 40, p. 535-40, 1992.

HIDAKA, K.; IUCHI, I. Determination of gene mutation of silent serum cholinesterase and its epidemiologic characters in the Japanese. **Rinsho Byori**, Tokyo, v. 43, p. 786-91, 1995.

HÖHLER, T.; HUNDT, M.; RITTNER, C.; SCHNEIDER, P.M.; BÜSCHENFELDE, K.H.M. Cholinesterase variants: rapid characterisation by PCR/SSCP and evidence for molecular homogeneity. **J. Med. Genet.**, London, v. 32, p. 109-112, 1995.

IZUMI, M.; MAEKAWA, M.; KANNO, T. Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: frequency of allele and associated enzyme activity in serum. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 40, p. 1606-1607, 1994.

JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, London, v. 2, p. 234-240, 1992.

JENSEN, F.S.; NIELSEN, L.R.; SCHWARTZ, M. Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. **Hum. Hered.**, New York, v. 46, p. 26-31, 1996.

JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. **Clin. Chem. Acta**, Amsterdam, v. 19, p. 205-208, 1968.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, Ottawa, v. 35, p. 1305-1320, 1957.

KALOW, W.; GUNN, D.R. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. **Ann. Hum. Genet.**, London, v. 23, p. 239-250, 1959.

KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 13, p. 239-243, 1980.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER JR, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucl. Acids Res.**, London, v. 19, p. 5444, 1991.

LANDO, G.; MOSCA, A.; BONORA, R.; AZZARIO, F.; PENCO, S.; MAROCCHI, A.; PANTEGHINIM, M.; PATROSSO, M.C. Frequency of butyrylcholinesterase gene mutations in individuals with abnormal inhibition numbers: an Italian-population study. **Pharmacogenetics**, London, v. 13, p. 265-270, 2003.

LAYER, P.G.; SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 84, p. 284-288, 1987.

LAYER, P.G.; WEIKERT, T.; WILLBOLD, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 268, p. 409-418, 1992.

LAYER, P.G. Non classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochem. Int.**, New York, v. 28, p. 491-495, 1996.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, p. 160, 1995.

LESSA, E.P.; APPLEBAUM, G. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. **Mol. Ecology**, Oxford, v. 2, p. 119-129, 1993.

LIDDELL, J.; LEHMANN, H.; SILK, E. A "silent" pseudocholinesterase gene. **Nature**, London, v. 193, p. 561-562, 1962.

LIU, W.; CHENG, L.; IWASAKI, A.; IMANISHI, H.; HADA, T. Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 326, p. 193-199, 2002.

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Comparison of atypical and usual serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 253, p. 361-366, 1978.

LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E.; JOHNSON, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 262, p. 549-557, 1987a.

LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S.; LA DU, B.N. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 262, p. 12945-12952, 1987b.

LOCKRIDGE, O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. **Pharmacol. Ther.** New York, v. 47, p. 35-60, 1990.

LOCKRIDGE, O.; BLONG, R.M.; MASSON, P.; FROMENT, M.T.; MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. **Biochem.**, London, v. 36, p. 786-795, 1997.

MACPHEE-QUIGLEY, K.; VEDVICK, T.S.; TAYLOR, P.; TAYLOR, S.S. Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 261, p. 13565-13570, 1986.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M.; ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 235, p. 41-57, 1995.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. **Clin. Chem.**, New York, v. 43, p. 924-9, 1997.

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In: MASSOULIÉ, J. (Ed.). **Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology**. Washington: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.

MASSON, P.; ADKINS, S.; GOUET, P.; LOCKRIDGE, O. Recombinant human butyrylcholinesterase G390V, the fluoride-2 variant, expressed in chinese hamster ovary cell, is a low affinity variant. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, p. 14329, 1993.

MASSON, P.; FROMENT, M.T.; BARTELS, C.F.; LOCKRIDGE, O. Importance of aspartate 70 in organophosphate inhibition, oxime re-activation and aging of human butyrylcholinesterase. **Biochem. J.**, London, v. 325, p. 53-61, 1997.

MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 86, p. 953-957, 1989.

MCTIERNAN, C.; ADKINS, S.; CHATONNET, A.; VAUGHN, T.A.; BARTELS,

C.F.; KOTT, M.; ROSENBERRY, T.L.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Brain cDNA clone for human cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 84, p. 6682-6686, 1987.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J.; HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 88, p. 11315-19, 1991.

NACHON, F.; NICOLET, Y.; VIGUIE, N.; MASSON, P.; FONTECILLA-CAMPS, J.C.; LOCKRIDGE, O. Engineering of a monomeric and low glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystalization. **Eur. J. Biochem.**, London, v. 269, p. 630-637, 2002.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Mol. Biol. Evol.**, New York, v. 3, p. 418-426, 1986.

NEITLICH, H.W. Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: a genetic variant. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 45, p. 380-387, 1966.

NOGUEIRA, C.P.; McGUIRE, M.C.; GRASER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117 (GGT → GGAG). **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 46, p. 934-942, 1990.

NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; McGUIRE, M.C. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 51, p. 821-828, 1992.

OMIM. On line inheritance in man. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>> Acesso 20 de janeiro de 2005.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 86, p. 2766-2770, 1989.

PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C.; PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; VIEIRA, M.M. An improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. **Biochem. Genet.**, New York, v. 32, p. 83-89, 1994.

PRIMO-PARMO, S.L. **Caracterização de nove alelos silenciosos novos da butirilcolinesterase humana a nível de ADN**. Curitiba, 1993. 99f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 58, p. 52-64, 1996.

PRIMO-PARMO, S.L.; LIGHSTONE, H.; LA DU, B.N. Characterization of an unstable variant (BchE115D) of human butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, London, v. 7, p. 27-34, 1997.

PROPERT, D.N.; BRACKENRIDGE, C.J. The relation of sex, age, smoking status, birth rank and parental ages to pseudocholinesterase activity and phenotypes in a sample of Australian caucasian adults. **Hum. Genet.**, Berlin, v. 32, p. 181-188, 1976.

RADIC, Z.; PICKERING, N.A.; VELLOM, D.C.; CAMP, S.; TAYLOR, P. Three domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition. **Biochem.**, London, v. 32, p. 12074-12084, 1993.

ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P.; ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. **J. Lab. Clin. Med.**, St Louis, v. 50, p. 745-752, 1957.

ROBSON, E.B.; HARRIS, H. Further data on the incidence and genetics of serum cholinesterase phenotype C5+. **Ann. Hum. Genet.**, Chicago, v. 29, p. 403-408, 1966.

ROBSON, E.B.; SUTHERLAND, I.; HARRIS, H. Evidence for linkage between the transferring (TF) and serum cholinesterase locus (E_1) in man. **Ann. Hum. Genet.**, Chicago, v. 29, p. 325-336, 1966.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. E_1^K , another quantitative variant at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, London, v. 15, p. 27-29, 1978.

SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUJISAWA, T.; MAEDA, M.; IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase – a case of a familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 274, p. 159-166, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2a. ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press USA, 1989.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. *Arlequin*, ver. 2000. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, Y.; NEWTON, M.; MACPHEE-QUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMAN, T.; TAYLOR, P. Primary structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature**,

London, v. 319, p. 407-409, 1986.

SHAFFERMAN, A.; KRONMAN, C.; FLASHNER, Y.; LEITNER, M.; GORSFELD, H.; ORDENTLICH, A.; GOZES, Y.; COHEN, S.; ARIEL, N.; BARAK, D.; HAREL, M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; VELAN, B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, p. 17640-17648, 1992.

SHEFFIELD, V.C.; BECK, J.S.; KWITEK, A.E.; SANDSTROM, D.W.; STONED, E.M. The sensivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. **Genomics**, San Diego, v. 16, p. 325-332, 1993.

SHIBUTA, K.; ABE, M.; SUZUKI, T. A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). **J. Med. Genet.**, London, v. 576-579, 1994.

SMALL, D.H. A function for butyrylcholinesterase? **J. Neurochem.**, Oxford, v. 64, p. 466-467, 1995.

SOUZA, R.L.R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C4/5) verificada em eletroforese**. Curitiba, 1995. 74f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA, L.; FREUND, A.A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA. Frequencises of the butyrylcholinesterase K mutation in the Brazilian population of European and African origin. **Hum. Biol.**, Detroit, v. 70, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R.L.R. **Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal**. Curitiba, 2001. 146f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, R.L.R.; FURTADO, L.; DINIZ, A.C.P.; SILVA, A.C.D.; KAISS, J.; PETZLER, M.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Studies on a heterologous complex formed by human butyrylcholinesterase. **Biochem. Genet.**, New York, v. 41, p.141-150, 2003.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, no prelo.

SPARKES, R.S.; FIELD, L.L.; SPARKES, M.C.; CRIST, M.; SPENCE, M.A.; JAMES, K.; GARRY, P.J. Genetic linkage studies of transferrin, pseudocholinesterase and chromosome 1 loci. **Human Hered.**, New York, v. 34, p. 96-100, 1984.

STASOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1 cd.

STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; CARRENHO, J.M.X. Studies on the *CHE1* locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Santa Catarina (Southern Brazil). **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 8, p. 535-543, 1985.

SUDO, K; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; KANNO, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 29, n. 2, p. 165-169, 1996.

SUDO, K; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H; TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 240, p. 372-375, 1997.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. A. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, Washington, v.253, p. 872-878, 1991.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belge Méd. Trop.**, Buxelles, v. 53, p. 633-644, 1973.

WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F.; LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 149, p. 549-551, 1947.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, London, v. 35, p. 174-197, 1980.

WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. New York: Karger, p. 1-126, 1986.

WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J. E_1^H , a new allele at cholinesterase locus 1. **Human Hered.**, New York, v. 37, p. 54-58, 1987.

YANG, F.; LUM, J.B.; MCGILL, J.R.; MOORE, C.M.; NAYLOR, S.L.; VAN BRAGT, P.H.; BALDWIN, W.D.; BOWMAN, B.H. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, Washington, v. 81, p. 2752-2756, 1984.

YOSHIDA, A.; MOTUSLKY, A.K. A pseudocholinesterase variant (E Cynthiana) associated with elevated plasma enzyme activity. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 21, p. 486-498, 1969.

XIE, W.; ALTAMIRANO, C.V.; BARTELS, C.F.; SPEIRS, R.J.; CASHMAN, J.R.; LOCKRIDGE, O. An improved cocaine hydrolase: the A328Y mutant of human butyrylcholinesterase is 4-fold more efficient. **Mol Pharmacol.**, New York, v. 55, p.

83-91, 1999.

ZAKUT, H.; ZAMIR, R.; SINDEL, L.; SOREQ, H. Gene mapping on chorionic villi chromosomes by hybridization in situ: chromosomes 3q21, 3q26-ter and 16q21. **Human Reprod.**, Oxford, v.4, p. 941-946, 1989.

9. APÊNDICES

Apêndice 1. Amostras selecionadas para o presente estudo de acordo, com IMC, idade, grupo étnico e sexo.

Alpe ¹	Sexo	Idade	Altura	Peso	Raça	IMC	Ativ ²	Data coleta	Data ativ	Estoc ³ (meses)	CHE2 ⁴
4	M	19	176	74	C	23,89	3,35	03/10/95	março-02	77	-
9	M	23	176	75	C	24,21	3,46	03/10/95	abril-02	78	-
24	M	26	167	65	C	23,31	3,69	04/10/95	abril-02	78	-
30	M	25	182	80	C	24,15		04/10/95			+
33	M	23	170	69	C	23,88	5,03	04/10/95	abril-02	78	-
45	M	20	179	75	C	23,41		05/10/95			+
50	M	26	170	65	C	22,49	3,98	05/10/95	abril-02	78	-
53	M	21	183	73	C	21,80	2,21	05/10/95	abril-02	78	-
57	M	24	178	75	C	23,67	3,4	05/10/95	abril-02	78	-
58	M	19	165	59	C	21,67	3,68	05/10/95	março-02	78	-
65	M	21	181	75	C	22,89	5,47	06/10/95	abril-02	78	-
71	M	19	176	75	C	24,21	2,99	06/10/95	abril-02	78	-
72	M	22	189	82	C	22,96	4,79	06/10/95	abril-02	78	-
77	M	25	160	63	C	24,61	3,49	06/10/95	abril-02	78	-
86	M	22	171	70	C	23,94	5,78	06/10/95	abril-02	78	-
89	M	26	180	72	C	22,22	3,05	06/10/95	abril-02	78	-
92	M	19	165	68	C	24,98	4,49	06/10/95	abril-02	78	-
100	M	28	180	72	C	22,22	2,84	06/10/95	abril-02	78	-
108	M	19	190	76	C	21,05	4,97	09/10/95	abril-02	78	-
110	M	25	178	78	C	24,62		09/10/95			+
111	M	19	170	64	C	22,15	3,59	09/10/95	abril-02	78	-
114	M	19	170	59	C	20,42	5,94	09/10/95	abril-02	78	-
116	M	19	173	65	C	21,72	4,76	09/10/95	abril-02	78	-
119	M	19	172	73	C	24,68	4,46	09/10/95	abril-02	78	-
122	M	19	171	64	C	21,89	4,04	09/10/95	abril-02	78	-
125	M	19	170	63	C	21,80	3,72	09/10/95	abril-02	78	-
126	M	19	167	62	C	22,23		09/10/95			+
127	M	19	170	70	C	24,22	5,23	09/10/95	abril-02	78	-
128	M	19	185	70	C	20,45	4,3	09/10/95	abril-02	78	-
130	M	19	178	78	C	24,62	3,87	09/10/95	abril-02	78	-
135	M	19	175	71	C	23,18	4,12	09/10/95	abril-02	78	-
137	M	19	185	85	C	24,84	4,77	09/10/95	abril-02	78	-
138	M	19	176	69	C	22,28	3,46	09/10/95	abril-02	78	-
139	M	19	180	72	C	22,22	4,5	09/10/95	abril-02	78	-
140	M	19	167	65	C	23,31	5,74	09/10/95	abril-02	78	-
141	M	19	165	61	C	22,41	4,13	09/10/95	abril-02	78	-
142	M	19	188	84	C	23,77	5,09	09/10/95	abril-02	78	-
143	M	19	175	72	C	23,51	1,9	09/10/95	abril-02	78	-
144	M	19	166	63	C	22,86		09/10/95			+
146	M	19	175	63	C	20,57	4,25	09/10/95	abril-02	78	-
147	M	19	181	68	C	20,76	3,47	09/10/95	abril-02	78	-
148	M	28	170	64	C	22,15	3,46	09/10/95	abril-02	78	-
151	M	19	170	63	C	21,80	4,13	09/10/95	abril-02	78	-

continua

continuação

152	M	22	180	76	C	23,46	5,91	09/10/95	abril-02	78	-
187	M	27	162	59	C	22,48		16/10/95			+
192	M	23	175	65	C	21,22	4,15	16/10/95	março-02	78	-
200	M	25	158	58	C	23,23	5,25	16/10/95	abril-02	78	-
205	M	19	175	63	C	20,57		16/10/95			+
208	M	22	180	72	C	22,22	2,77	17/10/95	abril-02	78	-
210	M	25	165	63	C	23,14	2,65	17/10/95	abril-02	78	-
212	M	22	175	64	C	20,90	3,35	17/10/95	abril-02	78	-
214	M	22	173	65	C	21,72	4,43	17/10/95	abril-02	78	-
217	M	19	179	72	C	22,47	2,87	17/10/95	abril-02	78	-
223	M	28	171	73	C	24,96	4,15	17/10/95	abril-02	78	-
233	M	19	179	76	C	23,72		18/10/95			+
252	M	23	180	75	C	23,15	4,26	18/10/95	abril-02	78	-
253	M	20	177	78	C	24,90	4,09	18/10/95	maio-02	79	-
256	M	18	180	70	C	21,60	4,72	18/10/95	março-02	78	-
257	M	20	176	71	C	22,92	5,34	18/10/95	maio-02	79	-
261	M	19	173	64	C	21,38	3,76	18/10/95	maio-02	79	-
267	M	19	176	67	C	21,63	4,98	18/10/95	maio-02	79	-
274	M	25	170	66	C	22,84		19/10/95			+
284	M	19	176	69	C	22,28	4,65	19/10/95	maio-02	79	-
285	M	18	160	58	C	22,66	3,93	19/10/95	maio-02	79	-
288	M	19	172	65	C	21,97	4,34	19/10/95	maio-02	79	-
289	M	25	169	64	C	22,41	6,65	19/10/95	maio-02	79	-
292	M	21	175	64	C	20,90	4,35	19/10/95	maio-02	79	-
294	M	24	170	63	C	21,80		19/10/95			+
295	M	23	182	73	C	22,04	4,09	19/10/95	maio-02	79	-
297	M	22	183	74	C	22,10	5,11	19/10/95	maio-02	79	-
301	M	23	170	70	C	24,22		19/10/95			+
302	M	19	171	65	C	22,23	4,93	19/10/95	maio-02	79	-
303	M	19	176	70	C	22,60	4,22	19/10/95	maio-02	79	-
304	M	19	178	66	C	20,83	4,51	19/10/95	maio-02	79	-
307	M	20	180	80	C	24,69		20/10/95			+
311	M	19	173	70	C	23,39	4,35	20/10/95	maio-02	79	-
316	M	18	182	80	C	24,15	5,22	23/10/95	maio-02	79	-
317	M	26	162	55	C	20,96		23/10/95			+
318	M	23	184	72	C	21,27	4,23	23/10/95	maio-02	79	-
323	M	24	170	63	C	21,80		23/10/95			+
326	M	22	173	72	C	24,06	4,53	23/10/95	maio-02	79	-
328	M	26	170	64	C	22,15	5,26	23/10/95	maio-02	79	-
342	M	26	164	67	C	24,91	4,04	23/10/95	maio-02	79	-
344	M	21	186	76	C	21,97		24/10/95			+
345	M	27	175	70	C	22,86	4,6	24/10/95	maio-02	79	-
349	M	21	172	69	C	23,32	4,43	24/10/95	maio-02	79	-
350	M	28	176	67	C	21,63		24/10/95			+
354	M	25	155	55	C	22,89	2,62	25/10/95	maio-02	79	-
355	M	28	184	71	C	20,97	4,25	25/10/95	maio-02	79	-
372	M	18	164	63	C	23,42	2,82	26/10/95	maio-02	79	-
377	M	18	180	74	C	22,84	3,32	27/10/95	maio-02	79	-
378	M	28	175	72	C	23,51	3,68	27/10/95	maio-02	79	-

continuação

387	M	21	188	81	C	22,92		27/10/95			+
389	M	25	165	57	C	20,94	3,46	27/10/95	maio-02	79	-
393	M	20	180	72	C	22,22	3,1	06/11/95	maio-02	78	-
396	M	21	170	70	C	24,22	4,6	07/11/95	maio-02	78	-
400	M	21	178	79	C	24,93	4,12	08/11/95	maio-02	78	-
401	M	25	168	67	C	23,74	3,81	08/11/95	maio-02	78	-
408	M	24	169	65	C	22,76	4,04	09/11/95	maio-02	78	-
409	M	28	178	78	C	24,62	7,04	09/11/95	maio-02	78	-
412	M	28	186	80	C	23,12	1,96	09/11/95	maio-02	78	-
429	M	21	167	60	C	21,51	3,37	10/11/95	maio-02	78	-
434	M	19	180	69	C	21,30	4,63	10/11/95	maio-02	78	-
442	M	28	170	61	C	21,11	4,78	13/11/95	maio-02	78	-
449	M	22	180	73	C	22,53		14/11/95			+
453	M	21	182	76	C	22,94		14/11/95			+
455	M	19	178	78	C	24,62	4,71	14/11/95	maio-02	78	-
457	M	22	182	73	C	22,04	5,02	14/11/95	maio-02	78	-
458	M	22	172	64	C	21,63	4,13	14/11/95	maio-02	78	-
459	M	23	181	78	C	23,81	4,31	14/11/95	maio-02	78	-
460	M	19	185	72	C	21,04	5	14/11/95	maio-02	78	-
461	M	19	174	66	C	21,80	4,4	14/11/95	maio-02	78	-
467	M	27	169	70	C	24,51	2,68	14/11/95	maio-02	78	-
469	M	19	183	74	C	22,10	5,22	14/11/95	maio-02	78	-
491	M	21	181	74	C	22,59	3,22	16/11/95	março-02	77	-
493	M	27	171	70	C	23,94	4,34	16/11/95	março-02	77	-
497	M	23	165	62	C	22,77	4,82	17/11/95	maio-02	78	-
508	M	19	157	59	C	23,94	5,02	20/11/95	maio-02	78	-
516	M	22	163	61	C	22,96	4,88	21/11/95	maio-02	78	-
518	M	28	176	76	C	24,54	4,82	21/11/95	maio-02	78	-
531	M	19	170	59	C	20,42		22/11/95			+
533	M	23	172	62	C	20,96	4,18	22/11/95	maio-02	78	-
539	M	18	163	63	C	23,71	4,87	24/11/95	maio-02	78	-
541	M	23	168	62	C	21,97	3,43	24/11/95	maio-02	78	-
542	M	27	158	58	C	23,23	4,15	24/11/95	maio-02	78	-
546	M	22	165	62	C	22,77	4	27/11/95	maio-02	78	-
567	M	27	182	68	C	20,53	3,56	04/12/95	maio-02	77	-
568	M	20	180	70	C	21,60	5,74	04/12/95	maio-02	77	-
572	M	24	170	67	C	23,18	5,97	05/12/95	maio-02	77	-
573	M	22	172	61	C	20,62	5,34	05/12/95	maio-02	77	-
575	M	21	172	70	C	23,66	4,22	05/12/95	maio-02	77	-
577	M	28	165	66	C	24,24	6,57	05/12/95	maio-02	77	-
594	M	27	168	63	C	22,32	5	07/12/95	maio-02	77	-
601	M	25	170	64	C	22,15		07/12/95			+
612	M	23	174	75	C	24,77	3,86	08/12/95	maio-02	77	-
614	M	22	175	71	C	23,18	5,43	08/12/95	maio-02	77	-
621	M	23	182	80	C	24,15	4,33	11/12/95	maio-02	77	-
631	M	24	164	58	C	21,56	4,78	11/12/95	maio-02	77	-
637	M	25	174	68	C	22,46		12/12/95			+
640	M	24	174	71	C	23,45	5,75	12/12/95	maio-02	77	-
645	M	25	169	70	C	24,51	7,1	12/12/95	maio-02	77	-

continua

continuação

649	M	26	170	66	C	22,84	3,66	12/12/95	maio-02	77	-
654	M	20	178	69	C	21,78	5,4	13/12/95	maio-02	77	-
656	M	27	162	54	C	20,58	4,85	13/12/95	maio-02	77	-
659 [#]	M	28	190	89	C	24,65	0,16	14/12/95	maio-02	77	-
660	M	21	184	80	C	23,63	3,65	14/12/95	março-02	76	-
665	M	21	173	74	C	24,73	4,12	14/12/95	maio-02	77	-
671	M	22	173	65	C	21,72	5,02	14/12/95	maio-02	77	-
678	M	19	178	72	C	22,72	5,1	14/12/95	maio-02	77	-
680	M	28	167	63	C	22,59	4,33	14/12/95	maio-02	77	-
693	M	20	184	73	C	21,56	4,74	28/03/96	maio-02	74	-
694	M	22	180	70	C	21,60	2,72	28/03/96	maio-02	74	-
699	M	25	179	80	C	24,97	5,7	28/03/96	maio-02	74	-
708	M	20	163	54	C	20,32	4,22	02/04/96	maio-02	73	-
710	M	25	178	65	C	20,52	3,99	03/04/96	maio-02	73	-
721	M	23	173	68	C	22,72	5,18	03/04/96	maio-02	73	-
722	M	20	175	69	C	22,53	2,86	03/04/96	maio-02	73	-
724	M	19	169	66	C	23,11	5,7	03/04/96	maio-02	73	-
740	M	22	165	58	C	21,30	5,01	10/04/96	março-02	72	-
742	M	21	174	61	C	20,15	4,51	10/04/96	maio-02	73	-
743	M	22	180	78	C	24,07	2,9	10/04/96	maio-02	73	-
744	M	20	164	59	C	21,94	4,51	10/04/96	maio-02	73	-
745	M	22	184	72	C	21,27	6,47	10/04/96	maio-02	73	-
749	M	27	170	72	C	24,91	5	10/04/96	junho-02	72	-
751	M	28	168	66	C	23,38	5,96	11/04/96	junho-02	72	-
755	M	19	165	56	C	20,57	3,91	11/04/96	março-02	72	-
757	M	20	173	62	C	20,72	4,82	11/04/96	junho-02	73	-
758	M	23	172	62	C	20,96		11/04/96			+
760	M	20	191	83	C	22,75	5,33	16/04/96	junho-02	73	-
761	M	23	165	63	C	23,14	5	16/04/96	junho-02	73	-
764	M	26	170	60	C	20,76	3,45	16/04/96	março-02	72	-
778	M	25	180	76	C	23,46	4,74	23/04/96	junho-02	73	-
780	M	20	171	61	C	20,86	5,27	23/04/96	junho-02	73	-
784	M	24	172	65	C	21,97	5,37	23/04/96	junho-02	73	-
788	M	28	165	57	C	20,94	5,7	24/04/96	junho-02	73	-
790	M	22	181	79	C	24,11	3,62	24/04/96	março-02	72	-
794	M	28	171	69	C	23,60	4,74	25/04/96	junho-02	73	-
795	M	24	169	70	C	24,51	5,18	25/04/96	junho-02	73	-
799	M	22	165	62	C	22,77		25/04/96			+
800	M	19	180	65	C	20,06	3,79	25/04/96	junho-02	73	-
815	M	22	173	73	C	24,39	5,25	02/05/96	março-02	72	-
828	M	28	165	65	C	23,88	6,36	07/05/96	junho-02	72	-
830	M	24	172	70	C	23,66	4,17	07/05/96	junho-02	72	-
832	M	24	164	65	C	24,17		07/05/96			+
833	M	21	157	56	C	22,72	4,52	07/05/96	junho-02	72	-
838	M	25	180	80	C	24,69	4,57	07/05/96	março-02	71	-
844	M	28	173	68	C	22,72	5,62	15/05/96	junho-02	73	-
845	M	21	183	73	C	21,80	3,66	15/05/96	junho-02	73	-
856	M	19	170	60	C	20,76	5,49	15/05/96	junho-02	73	-
859	M	19	173	64	C	21,38	4,93	15/05/96	junho-02	73	-

continua

continuação

862	M	26	170	72	C	24,91	6,5	16/05/96	junho-02	73	-
864	M	24	182	73	C	22,04	4,69	16/05/96	junho-02	73	-
868	M	28	174	67	C	22,13	5,6	21/05/96	junho-02	73	-
870	M	21	177	66	C	21,07	2,77	21/05/96	junho-02	73	-
881	M	28	161	59	C	22,76	4,81	22/05/96	junho-02	73	-
882	M	25	180	78	C	24,07	5,59	22/05/96	junho-02	73	-
887	M	25	172	64	C	21,63		22/05/96			+
892	M	27	182	77	C	23,25	6,29	23/05/96	junho-02	73	-
894	M	24	180	72	C	22,22	6,76	23/05/96	junho-02	73	-
901	M	22	170	67	C	23,18	5,31	28/05/96	junho-02	73	-
904	M	20	175	62	C	20,24	4,87	28/05/96	junho-02	73	-
905	M	20	170	64	C	22,15	4,47	28/05/96	junho-02	73	-
906	M	19	170	71	C	24,57	3,75	28/05/96	junho-02	73	-
907	M	19	180	68	C	20,99	4,01	28/05/96	junho-02	73	-
909	M	19	176	76	C	24,54	5,27	28/05/96	junho-02	73	-
910	M	18	181	68	C	20,76	2,26	28/05/96	junho-02	73	-
918	M	28	175	70	C	22,86	5,18	05/06/96	junho-02	72	-
920	M	18	170	64	C	22,15	4,92	05/06/96	março-02	71	-
925	M	23	175	68	C	22,20	5,25	11/06/96	junho-02	72	-
926	M	26	175	72	C	23,51	2,62	11/06/96	junho-02	72	-
928	M	20	175	74	C	24,16	4,52	11/06/96	junho-02	72	-
931	M	19	185	73	C	21,33	5,44	11/06/96	junho-02	72	-
933	M	21	171	63	C	21,55	4,23	11/06/96	junho-02	72	-
946	M	27	182	81	C	24,45	5,1	19/06/96	março-02	71	-
947	M	20	190	81	C	22,44	5,47	19/06/96	junho-02	72	-
949	M	28	169	68	C	23,81	4,61	19/06/96	junho-02	72	-
951	M	19	173	62	C	20,72	4,52	19/06/96	junho-02	72	-
952	M	23	186	74	C	21,39	4,83	19/06/96	junho-02	72	-
955	M	19	175	65	C	21,22	4,8	19/06/96	junho-02	72	-
956	M	19	175	64	C	20,90	5,02	19/06/96	junho-02	72	-
958	M	21	166	65	C	23,59	4,09	25/06/96	junho-02	72	-
959	M	19	173	65	C	21,72	4,71	25/06/96	junho-02	72	-
960	M	19	178	76	C	23,99	4,26	25/06/96	junho-02	72	-
962	M	20	170	63	C	21,80	4,38	25/06/96	junho-02	72	-
970	M	26	180	74	C	22,84		25/06/96			+
984	M	23	170	69	C	23,88	4,34	27/06/96	junho-02	72	-
987	M	25	181	76	C	23,20	2,19	27/06/96	junho-02	72	-
988	M	27	169	71	C	24,86	4,26	27/06/96	junho-02	72	-
989	M	23	175	65	C	21,22		27/06/96			+
990	M	24	175	72	C	23,51	5,32	27/06/96	março-02	71	-
995	M	22	179	80	C	24,97	5,41	02/07/96	junho-02	71	-
1004	M	18	177	68	C	21,71	4,75	08/10/96	junho-02	68	-
1006	M	23	175	70	C	22,86	5,1	08/10/96	junho-02	68	-
1007	M	19	179	74	C	23,10	4,56	08/10/96	junho-02	68	-
1008	M	20	179	80	C	24,97	6,4	08/10/96	junho-02	68	-
1009	M	18	177	73	C	23,30		08/10/96			+
1015	M	27	192	90	C	24,41	4,2	08/10/96	junho-02	68	-
1018	M	21	172	68	C	22,99	5,78	08/10/96	junho-02	68	-
1019	M	22	168	60	C	21,26	4,66	08/10/96	junho-02	68	-

continua

continuação

1020	M	21	170	62	C	21,45	4,29	08/10/96	junho-02	68	-
1024	M	20	170	67	C	23,18	3,73	09/10/96	junho-02	68	-
1028	M	27	192	80	C	21,70	6,32	09/10/96	junho-02	68	-
1032	M	21	179	68	C	21,22	5,42	09/10/96	junho-02	68	-
1035 [#]	M	20	180	75	C	23,15	1,79	10/10/96	junho-02	68	-
1036	M	20	165	63	C	23,14	4,72	10/10/96	junho-02	68	-
1038	M	23	172	72	C	24,34	3,31	10/10/96	junho-02	68	-
1040	M	19	178	68	C	21,46	5,59	10/10/96	junho-02	68	-
1044	M	22	175	71	C	23,18	3,63	15/10/96	junho-02	68	-
1047	M	24	168	64	C	22,68	4,52	15/10/96	junho-02	68	-
1051	M	20	184	81	C	23,92	6,15	15/10/96	junho-02	68	-
1052	M	20	164	64	C	23,80	2,32	15/10/96	junho-02	68	-
1057	M	22	175	75	C	24,49		15/10/96			+
1059	M	18	172	62	C	20,96	4,3	16/10/96	junho-02	68	-
1063	M	21	176	67	C	21,63	4,12	16/10/96	junho-02	68	-
1068	M	19	180	73	C	22,53	5,2	17/10/96	junho-02	68	-
1069	M	20	174	68	C	22,46	4,66	17/10/96	junho-02	68	-
1074	M	19	180	80	C	24,69	4,66	17/10/96	junho-02	68	-
1076	M	27	172	63	C	21,30	4,52	17/10/96	junho-02	68	-
1085	M	27	175	69	C	22,53	6,26	17/10/96	junho-02	68	-
1098	M	22	169	69	C	24,16	4,23	22/10/96	junho-02	68	-
1105	M	22	176	65	C	20,98	3,28	23/10/96	junho-02	68	-
1115	M	25	165	60	C	22,04	5,17	23/10/96	junho-02	68	-
1125	M	22	181	77	C	23,50	3,46	24/10/96	junho-02	68	-
1128	M	19	181	81	C	24,72	3,99	24/10/96	junho-02	68	-
1129	M	24	185	81	C	23,67	3,86	24/10/96	junho-02	68	-
1131	M	28	175	68	C	22,20	5,13	24/10/96	junho-02	68	-
1132	M	21	180	78	C	24,07	3,63	24/10/96	junho-02	68	-
1134	M	22	178	76	C	23,99	4,12	24/10/96	junho-02	68	-
1135	M	25	180	80	C	24,69	4,57	29/10/96	março-02	66	-
1136	M	23	175	73	C	23,84	4,67	29/10/96	junho-02	68	-
1137	M	19	177	65	C	20,75	2,97	29/10/96	junho-02	68	-
1138	M	20	190	83	C	22,99	3,85	29/10/96	junho-02	68	-
1139	M	20	188	83	C	23,48		29/10/96			+
1144	M	19	175	73	C	23,84	4,16	31/10/96	junho-02	68	-
1145	M	22	174	61	C	20,15	5,04	31/10/96	junho-02	68	-
1148	M	18	178	79	C	24,93	6,21	31/10/96	junho-02	68	-
1150	M	18	180	74	C	22,84		31/10/96			+
1159	M	21	172	69	C	23,32	5,04	05/11/96	junho-02	67	-
1168	M	26	172	65	C	21,97	4,69	05/11/96	junho-02	67	-
1170	M	28	169	71	C	24,86	5,25	12/11/96	junho-02	67	-
1174	M	26	185	80	C	23,37	5,66	14/11/96	junho-02	67	-
1179	M	26	172	62	C	20,96	5,55	20/11/96	junho-02	67	-
1181	M	24	180	79	C	24,38	2,98	20/11/96	abril-02	66	-
1186	M	20	180	73	C	22,53	3,54	21/11/96	junho-02	67	-
1191	M	20	177	75	C	23,94	5,4	18/03/97	junho-02	63	-
1192	M	28	178	76	C	23,99	5,78	18/03/97	junho-02	63	-
1194	M	22	175	68	C	22,20	6,13	18/03/97	março-02	62	-

continua

continuação

1200	M	25	175	72	C	23,51		18/03/97			+
1206	M	25	185	75	C	21,91	3,77	18/03/97	junho-02	63	-
1209	M	19	192	85	C	23,06	3,2	25/03/97	junho-02	63	-
1223	M	20	180	75	C	23,15	4,6	25/03/97	junho-02	63	-
1226	M	28	184	84	C	24,81	6,51	01/04/97	junho-02	62	-
1233	M	28	180	80	C	24,69		01/04/97			+
1243	M	20	178	76	C	23,99	4,83	15/04/97	junho-02	62	-
1244	M	20	182	76	C	22,94	3,78	15/04/97	junho-02	62	-
1250	M	23	170	60	C	20,76		15/04/97			+
1254	M	22	170	70	C	24,22	5,37	15/04/97	junho-02	62	-
1256	M	19	171	64	C	21,89	5,31	15/04/97	junho-02	62	-
1262	M	25	165	60	C	22,04	3,57	22/04/97	junho-02	62	-
1263	M	20	169	69	C	24,16	2,62	22/04/97	junho-02	62	-
1266	M	21	174	72	C	23,78	2,62	22/04/97	junho-02	62	-
1272	M	18	180	75	C	23,15	4,88	22/04/97	junho-02	62	-
1288	M	23	168	68	C	24,09	3,95	24/04/97	junho-02	62	-
1291	M	28	173	72	C	24,06	5,75	24/04/97	junho-02	62	-
1297	M	20	184	84	C	24,81	5,4	24/04/97	junho-02	62	-
1309	M	28	170	64	C	22,15	8,21	30/04/97	junho-02	62	-
1310	M	27	178	68	C	21,46	5,15	30/04/97	março-02	60	-
1319	M	25	156	58	C	23,83	5,57	08/05/97	março-02	59	-
1335	M	21	179	78	C	24,34	4,12	14/05/97	junho-02	61	-
1336	M	21	172	69	C	23,32	5,36	14/05/97	junho-02	61	-
1339	M	27	177	77	C	24,58	5,24	14/05/97	junho-02	61	-
1341	M	24	171	72	C	24,62	3,96	14/05/97	junho-02	61	-
1344	M	23	190	90	C	24,93	3,75	14/05/97	junho-02	61	-
1346	M	22	184	84	C	24,81	5,37	14/05/97	junho-02	61	-
1349	M	18	176	70	C	22,60	3,11	14/05/97	junho-02	61	-
1355	M	22	173	70	C	23,39	5,22	14/05/97	junho-02	61	-
1363	M	24	167	65	C	23,31	3,79	16/05/97	junho-02	61	-
1368	M	28	161	61	C	23,53		19/05/97		61	+
1370*	M	21	183	72	C	21,50	3,84	—	junho-02	—	-
1385	M	27	172	64	C	21,63	3,82	21/05/97	junho-02	61	-
1405	M	25	160	55	C	21,48	2,73	27/05/97	junho-02	61	-
1406	M	27	178	65	C	20,52	3,29	27/05/97	junho-02	61	-
1408	M	26	172	64	C	21,63	3,38	27/05/97	junho-02	61	-
1409	M	20	168	58	C	20,55	5,87	27/05/97	junho-02	61	-
1410	M	23	168	69	C	24,45	4,56	27/05/97	junho-02	61	-
1411	M	22	172	62	C	20,96	4,87	27/05/97	junho-02	61	-
1419	M	18	181	71	C	21,67	5,53	04/06/97	junho-02	60	-
1421	M	21	164	59	C	21,94	3,33	04/06/97	junho-02	60	-
1422	M	21	192	92	C	24,96	4,45	04/06/97	junho-02	60	-
1423	M	21	181	70	C	21,37	5,19	04/06/97	junho-02	60	-
1426	M	18	184	68	C	20,09	4,34	04/06/97	junho-02	60	-
1429	M	20	170	68	C	23,53	4,06	04/06/97	junho-02	60	-
1430	M	20	180	78	C	24,07	5,37	04/06/97	junho-02	60	-
1433	M	20	170	65	C	22,49	4,56	04/06/97	junho-02	60	-
1438	M	19	170	60	C	20,76	3,37	04/06/97	junho-02	60	-
1440	M	19	183	79	C	23,59	2,52	04/06/97	junho-02	60	-

continua

continuação

1441	M	18	175	64	C	20,90	5	04/06/97	junho-02	60	-
1444	M	19	184	74	C	21,86	4,34	04/06/97	junho-02	60	-
1446	M	24	175	73	C	23,84	3,02	04/06/97	junho-02	60	-
1457	M	21	165	62	C	22,77		28/05/97			+
1458	M	28	172	62	C	20,96	5,47	28/05/97	junho-02	60	-
1464	M	20	172	60	C	20,28		04/06/97			+
1470	M	19	180	72	C	22,22	5,18	04/06/97	junho-02	60	-
1479	M	18	176	65	C	20,98		05/06/97			+
1481	M	18	177	67	C	21,39	3,36	05/06/97	junho-02	60	-
1489	M	21	184	68	C	20,09	5,21	05/06/97	junho-02	60	-
1491	M	18	175	65	C	21,22	5,98	05/06/97	junho-02	60	-
1493	M	21	171	63	C	21,55	4,25	12/06/97	junho-02	60	-
1494	M	20	186	79	C	22,84	5,21	12/06/97	junho-02	60	-
1498	M	22	178	73	C	23,04	5,33	12/06/97	junho-02	60	-
1499	M	23	189	72	C	20,16	3,57	12/06/97	junho-02	60	-
1501	M	21	184	83	C	24,52	4,91	12/06/97	junho-02	60	-
1503	M	23	179	78	C	24,34	4,6	12/06/97	junho-02	60	-
1506	M	26	183	80	C	23,89	4,71	12/06/97	junho-02	60	-
1510	M	20	179	70	C	21,85	5,93	12/06/97	junho-02	60	-
1514	M	28	177	67	C	21,39		02/07/97			+
1518	M	23	178	78	C	24,62	5,66	02/07/97	junho-02	59	-
1522	M	21	178	78	C	24,62	4,57	02/07/97	junho-02	59	-
1524	M	27	173	60	C	20,05	2,83	01/07/97	junho-02	59	-
1526	M	22	160	62	C	24,22	3,46	01/07/97	junho-02	59	-
1529	M	22	180	72	C	22,22		01/07/97			+
1531	M	26	180	71	C	21,91	4,49	01/07/97	junho-02	59	-
1539	M	24	183	71	C	21,20		01/07/97			+
1540	M	20	169	64	C	22,41	5	01/07/97	junho-02	59	-
1541	M	22	170	63	C	21,80		01/07/97			+
1544	M	20	167	62	C	22,23	5,37	07/07/97	junho-02	59	-
1546	M	25	180	76	C	23,46	4,53	07/07/97	março-02	57	-
1555	M	21	177	74	C	23,62	6,14	07/07/97	junho-02	59	-
1558	M	27	166	67	C	24,31	5,6	07/07/97	junho-02	59	-
1568	M	27	173	69	C	23,05	3,77	08/07/97	junho-02	59	-
1594	M	19	176	72	C	23,24	3,08	08/07/97	junho-02	59	-
1600	M	19	175	71	C	23,18	5,47	21/07/97	junho-02	59	-
1606	M	23	178	74	C	23,36	4,85	28/07/97	junho-02	59	-
1607	M	23	184	82	C	24,22	4,06	28/07/97	junho-02	59	-
1609	M	21	169	65	C	22,76	5,22	28/07/97	junho-02	59	-
1617	M	27	170	64	C	22,15	5,34	28/07/97	junho-02	59	-
1624	M	21	173	69	C	23,05	6,05	28/07/97	junho-02	59	-
1637	M	20	175	69	C	22,53	4,71	28/07/97	junho-02	59	-
1641	M	22	170	63	C	21,80	4,24	05/08/97	junho-02	58	-
1642	M	20	168	62	C	21,97	4,56	05/08/97	junho-02	58	-
1643	M	23	174	65	C	21,47	4,32	05/08/97	junho-02	58	-
1647	M	23	170	68	C	23,53	4,49	05/08/97	junho-02	58	-
1653	M	24	178	67	C	21,15	4,22	05/08/97	junho-02	58	-
1658	M	27	176	75	C	24,21	4,36	05/08/97	junho-02	58	-
1662	M	23	168	66	C	23,38	3,72	05/08/97	junho-02	58	-

continua

continuação

1663	M	21	170	72	C	24,91	4,96	05/08/97	junho-02	58	-
1672	M	21	165	68	C	24,98	4,38	05/08/97	junho-02	58	-
1675	M	27	182	79	C	23,85	4,03	15/08/97	junho-02	58	-
1679	M	27	187	76	C	21,73	4	15/08/97	junho-02	58	-
1684	M	20	185	82	C	23,96	5,46	15/08/97	junho-02	58	-
1686	M	27	178	72	C	22,72	3,6	15/08/97	junho-02	58	-
1688	M	20	196	83	C	21,61	4,24	15/08/97	junho-02	58	-
1689	M	22	180	71	C	21,91	4,4	15/08/97	junho-02	58	-
1695	M	25	170	66	C	22,84	5,72	15/08/97	junho-02	58	-
1696	M	20	173	62	C	20,72	3,78	11/08/97	junho-02	58	-
1706	M	23	180	70	C	21,60	6,27	11/08/97	junho-02	58	-
1728	M	27	168	65	C	23,03	5,44	11/08/97	junho-02	58	-
1730	M	27	165	68	C	24,98	5,53	11/08/97	junho-02	58	-
1735	M	18	172	70	C	23,66	4,44	19/08/97	junho-02	58	-
1753	M	22	162	60	C	22,86	5,31	26/08/97	junho-02	58	-
1782	M	22	167	65	C	23,31	5,77	02/09/97	junho-02	57	-
1791	M	27	174	68	C	22,46		02/09/97			+
1793	M	26	180	77	C	23,77	7,41	02/09/97	junho-02	57	-
1797	M	22	175	70	C	22,86	3,35	09/09/97	junho-02	57	-
1800	M	24	180	70	C	21,60		09/09/97			+
1805	M	23	182	80	C	24,15		09/09/97			+
1822	M	21	178	71	C	22,41	5,29	09/09/97	junho-02	57	-
1832	M	26	188	78	C	22,07	3,74	12/09/97	junho-02	57	-
1833	M	28	176	77	C	24,86	3,62	12/09/97	junho-02	57	-
1836	M	28	175	70	C	22,86	3,9	16/09/97	junho-02	57	-
1838	M	22	180	76	C	23,46	4,5	16/09/97	junho-02	57	-
1843	M	24	175	70	C	22,86	4,23	16/09/97	junho-02	57	-
1847	M	26	166	64	C	23,23	3,15	17/09/97	junho-02	57	-
1848	M	20	170	70	C	24,22	5,22	17/09/97	junho-02	57	-
1855	M	27	179	79	C	24,66	5,66	15/09/97	junho-02	57	-
1862	M	28	185	78	C	22,79	3,34	17/09/97	junho-02	57	-
1864	M	21	173	66	C	22,05	3,81	17/09/97	junho-02	57	-
1867	M	21	172	60	C	20,28	4,29	23/09/97	junho-02	57	-
1878	M	23	177	75	C	23,94	5,22	23/09/97	junho-02	57	-
1880	M	22	170	70	C	24,22		23/09/97			+
1884	M	21	177	77	C	24,58	3,68	23/09/97	junho-02	57	-
1885	M	20	185	71	C	20,75	5,1	23/09/97	junho-02	57	-
1888	M	20	168	59	C	20,90	4,24	23/09/97	junho-02	57	-
1889	M	20	171	69	C	23,60		23/09/97			+
1893	M	23	180	80	C	24,69	4,74	23/09/97	junho-02	57	-
1897	M	26	175	65	C	21,22	4,31	23/09/97	junho-02	57	-
1898	M	19	177	65	C	20,75	4,38	23/09/97	junho-02	57	-
1899	M	27	162	55	C	20,96	4,93	23/09/97	junho-02	57	-
1903	M	25	176	67	C	21,63	4,1	03/10/97	junho-02	56	-
1904	M	23	175	66	C	21,55	4,13	03/10/97	junho-02	56	-
1906	M	19	175	69	C	22,53	5,41	03/10/97	junho-02	56	-
1908	M	25	173	60	C	20,05	5,16	03/10/97	junho-02	56	-
1914	M	23	176	74	C	23,89	5,1	23/09/97	junho-02	57	-
1918	M	27	180	80	C	24,69	4,65	23/09/97	junho-02	57	-

continua

continuação

1920	M	20	173	73	C	24,39	4,22	23/09/97	junho-02	57	-
1929*	M	21	175	68	C	22,20	6,12	—	junho-02	—	-
1933	M	20	177	75	C	23,94	4,94	10/10/97	junho-02	56	-
1934	M	23	180	68	C	20,99	3,81	10/10/97	junho-02	56	-
1936	M	24	170	63	C	21,80	4,41	10/10/97	junho-02	56	-
1937	M	20	180	81	C	25,00		10/10/97			+
1939	M	20	178	69	C	21,78	3,66	10/10/97	junho-02	56	-
1940	M	23	175	73	C	23,84	4,26	07/10/97	junho-02	56	-
1943	M	28	172	70	C	23,66	3,9	10/10/97	junho-02	56	-
1944	M	20	176	64	C	20,66	5,29	10/10/97	junho-02	56	-
1947	M	21	178	65	C	20,52	3,81	10/10/97	junho-02	56	-
1948	M	26	168	65	C	23,03	6,01	10/10/97	junho-02	56	-
1950	M	27	177	64	C	20,43	6,29	10/10/97	junho-02	56	-
1951	M	22	183	75	C	22,40	5,93	14/10/97	junho-02	56	-
1953	M	24	169	63	C	22,06		10/10/97			+
1956	M	28	171	64	C	21,89		14/10/97			+
1957	M	27	167	64	C	22,95	2,93	14/10/97	junho-02	56	-
1958	M	27	164	66	C	24,54	4,57	14/10/97	junho-02	56	-
1959	M	25	178	78	C	24,62		14/10/97			+
1960	M	20	175	68	C	22,20	6,41	14/10/97	junho-02	56	-
1963	M	25	178	77	C	24,30	3,91	14/10/97	junho-02	56	-
1965	M	26	180	68	C	20,99	4,59	14/10/97	junho-02	56	-
1969	M	19	175	72	C	23,51	3,82	14/10/97	junho-02	56	-
1972	M	28	186	72	C	20,81		14/10/97			+
1975	M	25	175	67	C	21,88	4,63	20/10/97	junho-02	56	-
1979	M	21	177	72	C	22,98	5,13	21/10/97	junho-02	56	-
1981	M	22	178	67	C	21,15	3,62	21/10/97	junho-02	56	-
1982	M	20	179	73	C	22,78	5,59	21/10/97	junho-02	56	-
1984	M	22	169	70	C	24,51	4,56	21/10/97	junho-02	56	-
1985	M	24	190	81	C	22,44	4,31	21/10/97	junho-02	56	-
1989	M	19	184	75	C	22,15	4,78	21/10/97	junho-02	56	-
1991	M	23	175	73	C	23,84	5,07	21/10/97	junho-02	56	-
1992	M	23	181	75	C	22,89		21/10/97			+
1993	M	28	175	68	C	22,20	4,49	21/10/97	junho-02	56	-
1997	M	26	179	80	C	24,97	3,21	24/10/97	junho-02	56	-
1999	M	20	188	74	C	20,94	4,25	24/10/97	junho-02	56	-
2041	M	26	185	84	C	24,54	5,66	03/11/97	junho-02	55	-
2045	M	23	161	64	C	24,69	2,93	03/11/97	junho-02	55	-
2051	M	23	165	60	C	22,04	5,38	11/11/97	junho-02	55	-
2061	M	28	185	70	C	20,45	4,68	11/11/97	junho-02	55	-
2065	M	21	176	70	C	22,60	5,69	11/11/97	junho-02	55	-
2069	M	21	163	55	C	20,70	5,02	05/12/97	junho-02	54	-
2077	M	21	174	72	C	23,78		01/12/97			+
2084	M	19	175	66	C	21,55	3,87	01/12/97	junho-02	54	-
2087	M	20	170	65	C	22,49	4,71	05/12/97	junho-02	54	-
2088	M	23	168	67	C	23,74	5,19	05/12/97	junho-02	54	-
2103	M	24	169	62	C	21,71	4,68	04/12/97	junho-02	54	-
2106	M	28	170	70	C	24,22	4,12	04/12/97	junho-02	54	-
2117	M	22	170	65	C	22,49		11/12/97			+

continua

continuação

2126	M	23	175	75	C	24,49	4,36	15/12/97	junho-02	54	-
2129	M	25	175	68	C	22,20	4,75	16/12/97	junho-02	54	-
2134	M	25	175	65	C	21,22	4,45	15/12/97	junho-02	54	-
2139	M	28	158	62	C	24,84	3,46	16/12/97	junho-02	54	-
2141	M	20	158	57	C	22,83	4,66	04/02/98	junho-02	52	-
2147	M	23	172	64	C	21,63	4,52	04/02/98	junho-02	52	-
2152	M	28	174	73	C	24,11	5,74	04/02/98	junho-02	52	-
2164	M	22	179	72	C	22,47	4,63	18/02/98	junho-02	52	-
2165	M	19	170	70	C	24,22	4,09	18/02/98	junho-02	52	-
2176	M	25	181	78	C	23,81	5,53	18/02/98	junho-02	52	-
2186	M	28	174	70	C	23,12	5,6	18/02/98	junho-02	52	-
2188	M	22	177	68	C	21,71	4,73	13/02/98	junho-02	52	-
2190	M	23	183	75	C	22,40		27/02/98			+
2196	M	26	155	52	C	21,64	4,97	27/02/98	junho-02	52	-
2216	M	27	169	67	C	23,46	2,03	27/02/98	junho-02	52	-
2229	M	26	165	68	C	24,98	5,55	05/03/98	julho-02	52	-
2230	M	21	184	79	C	23,33	6,07	05/03/98	julho-02	52	-
2240	M	26	168	61	C	21,61	4,68	09/03/98	julho-02	52	-
2248	M	27	188	72	C	20,37		09/03/98			+
2249	M	24	170	67	C	23,18	5,63	05/03/98	julho-02	52	-
2255	M	23	180	80	C	24,69	6,15	12/03/98	julho-02	52	-
2262	M	19	169	69	C	24,16	5,56	16/03/98	julho-02	52	-
2265	M	22	175	62	C	20,24	5,43	26/03/98	julho-02	52	-
2266	M	28	180	80	C	24,69	4,99	26/03/98	julho-02	52	-
2271	M	18	186	75	C	21,68	4,1	26/03/98	julho-02	52	-
2274	M	26	170	72	C	24,91	5,23	26/03/98	julho-02	52	-
2276	M	25	186	78	C	22,55	6,01	30/03/98	julho-02	52	-
2279	M	22	175	62	C	20,24	4,88	26/03/98	julho-02	52	-
2289	M	25	172	64	C	21,63	4,71	31/03/98	julho-02	52	-
2290	M	26	168	60	C	21,26		31/03/98			+
2292	M	26	170	67	C	23,18	4,75	31/03/98	julho-02	52	-
2293	M	21	172	60	C	20,28	4,91	31/03/98	julho-02	52	-
2294	M	27	170	58	C	20,07	4,83	31/03/98	julho-02	52	-
2298	M	21	182	74	C	22,34		31/03/98			+
2305	M	23	188	79	C	22,35		31/03/98			+
2308	M	19	168	65	C	23,03	5,31	31/03/98	julho-02	52	-
2310	M	19	176	69	C	22,28	3,47	23/03/98	julho-02	52	-
2312	M	19	170	65	C	22,49	4,58	31/03/98	julho-02	52	-
2313	M	24	177	72	C	22,98	4,09	31/03/98	julho-02	52	-
2315	M	25	170	64	C	22,15	5,24	23/03/98	julho-02	52	-
2322	M	23	184	83	C	24,52	5,13	31/03/98	julho-02	52	-
2325	M	27	180	72	C	22,22	4,07	01/04/98	julho-02	52	-
2330	M	27	177	65	C	20,75		22/04/98			+
2331	M	20	185	77	C	22,50	4	22/04/98	julho-02	51	-
2338	M	27	178	65	C	20,52	4,22	22/04/98	julho-02	51	-
2347	M	21	168	64	C	22,68	4,04	24/04/98	julho-02	51	-
2352	M	20	170	63	C	21,80	4,91	24/04/98	julho-02	51	-
2354	M	23	175	62	C	20,24	4,25	24/04/98	julho-02	51	-
2356	M	24	168	68	C	24,09	5,06	24/04/98	julho-02	51	-

continua

continuação

2357	M	27	177	68	C	21,71	4,68	24/04/98	julho-02	51	-
2358	M	24	174	74	C	24,44	5,15	24/04/98	julho-02	51	-
2370	M	20	170	60	C	20,76	4,88	22/04/98	julho-02	51	-
2374	M	25	163	62	C	23,34	4,91	27/04/98	julho-02	51	-
2383	M	25	174	73	C	24,11	6,38	27/04/98	julho-02	51	-
2386	M	28	165	62	C	22,77		27/04/98			+
2390	M	21	180	79	C	24,38	4,82	27/04/98	julho-02	51	-
2393	M	22	178	74	C	23,36	5,06	27/04/98	julho-02	51	-
2415	M	23	177	65	C	20,75	4,72	27/04/98	julho-02	51	-
2416	M	24	177	65	C	20,75	4,69	27/04/98	julho-02	51	-
2422	M	27	168	59	C	20,90		27/04/98			+
2425	M	22	180	79	C	24,38	6,1	27/04/98	julho-02	51	-
2435	M	24	160	55	C	21,48	3,86	27/04/98	julho-02	51	-
2438	M	28	172	72	C	24,34	4,59	27/04/98	julho-02	51	-
2439	M	21	170	63	C	21,80	6,03	27/04/98	julho-02	51	-
2440	M	19	174	69	C	22,79	4,6	27/04/98	julho-02	51	-
2443	M	22	182	79	C	23,85	5,28	27/04/98	julho-02	51	-
2445	M	26	168	65	C	23,03		27/04/98			+
2446	M	24	174	72	C	23,78	4,96	27/04/98	julho-02	51	-
2451	M	20	181	75	C	22,89		27/04/98			+
2457	M	22	185	74	C	21,62	5,13	27/04/98	julho-02	51	-
2459	M	20	171	72	C	24,62		27/04/98			+
2461	M	24	173	67	C	22,39	4,13	27/04/98	julho-02	51	-
2465	M	19	172	64	C	21,63	4,85	27/04/98	julho-02	51	-
2469	M	24	170	64	C	22,15	5,07	27/04/98	julho-02	51	-
2473	M	27	175	68	C	22,20	4,76	27/04/98	julho-02	51	-
2478	M	22	188	87	C	24,62	4,6	27/04/98	julho-02	51	-
2484	M	24	170	66	C	22,84		05/05/98			+
2503	M	26	170	58	C	20,07	4,81	05/05/98	julho-02	50	-
2515	M	24	183	75	C	22,40	5,63	05/05/98	julho-02	50	-
2517	M	22	174	68	C	22,46	5,29	05/05/98	julho-02	50	-
2525	M	26	165	62	C	22,77	5,09	05/05/98	julho-02	50	-
2541	M	28	180	73	C	22,53		05/05/98			+
2545	M	19	178	75	C	23,67	2,9	05/05/98	julho-02	50	-
2546	M	28	164	61	C	22,68	5,74	05/05/98	julho-02	50	-
2547	M	19	164	59	C	21,94	4,85	05/05/98	julho-02	50	-
2554	M	24	166	65	C	23,59	6,49	05/05/98	julho-02	50	-
2565	M	23	181	72	C	21,98	6,44	21/05/98	julho-02	50	-
2572	M	22	180	70	C	21,60	4,57	21/05/98	julho-02	50	-
2577	M	20	178	68	C	21,46	4,51	21/05/98	julho-02	50	-
2582	M	21	174	63	C	20,81	4,57	25/05/98	julho-02	50	-
2587	M	21	181	76	C	23,20	4,15	25/05/98	julho-02	50	-
2588	M	25	183	72	C	21,50	5,69	25/05/98	julho-02	50	-
2592	M	20	180	76	C	23,46	5,01	25/05/98	julho-02	50	-
2600	M	23	175	64	C	20,90	4,63	25/05/98	julho-02	50	-
2603	M	22	173	68	C	22,72	2,85	26/05/98	julho-02	50	-
2613	M	24	178	71	C	22,41	4,96	26/05/98	julho-02	50	-
2622	M	28	180	70	C	21,60	4,19	26/05/98	julho-02	50	-
2630	M	23	179	76	C	23,72	4,57	25/05/98	julho-02	50	-

continua

continuação

2639	M	22	175	68	C	22,20	4,1	25/05/98	julho-02	50	-
2640	M	25	178	66	C	20,83	5,9	25/05/98	julho-02	50	-
2641	M	19	172	68	C	22,99	5,42	25/05/98	julho-02	50	-
2645	M	20	170	69	C	23,88	6,21	25/05/98	julho-02	50	-
2657	M	26	184	84	C	24,81	5,37	02/06/98	julho-02	49	-
2660	M	27	157	56	C	22,72	4,6	02/06/98	julho-02	49	-
2669	M	22	186	78	C	22,55	3,84	15/06/98	julho-02	49	-
2679	M	19	179	75	C	23,41	4,9	15/06/98	julho-02	49	-
2681	M	18	175	73	C	23,84	4,65	15/06/98	julho-02	49	-
2687	M	28	187	80	C	22,88	4,96	15/06/98	julho-02	49	-
2696	M	28	177	72	C	22,98	6,32	15/06/98	julho-02	49	-
2698	M	19	175	64	C	20,90	4,15	25/06/98	julho-02	49	-
2705	M	26	171	63	C	21,55		22/06/98			+
2709	M	23	168	63	C	22,32	4,76	22/06/98	julho-02	49	-
2716	M	26	175	64	C	20,90	4,43	22/06/98	julho-02	49	-
2726	M	27	164	60	C	22,31	4,38	22/06/98	julho-02	49	-
2730	M	26	170	68	C	23,53		22/06/98			+
2731	M	20	159	62	C	24,52	4,98	20/06/98	julho-02	49	-
2735	M	22	175	68	C	22,20	3,7	20/06/98	julho-02	49	-
2746	M	27	170	68	C	23,53	5,04	20/06/98	julho-02	49	-
2753	M	19	164	65	C	24,17	5,38	20/06/98	julho-02	49	-
2754	M	19	169	67	C	23,46	3,09	20/06/98	julho-02	49	-
2756	M	21	179	68	C	21,22		22/06/98			+
2757	M	18	176	76	C	24,54	6,01	22/06/98	julho-02	49	-
2762	M	20	185	75	C	21,91	4,21	20/06/98	julho-02	49	-
2765	M	20	169	68	C	23,81	5,39	20/06/98	julho-02	49	-
2767	M	21	163	63	C	23,71	5,29	22/06/98	julho-02	49	-
2770	M	19	168	64	C	22,68	4,51	22/06/98	julho-02	49	-
2778	M	28	163	65	C	24,46	4,38	25/06/98	julho-02	49	-
2780	M	22	168	68	C	24,09		25/06/98			+
2784	M	22	175	63	C	20,57	3,38	25/06/98	julho-02	49	-
2789	M	18	172	60	C	20,28	4,57	25/06/98	julho-02	49	-
2795	M	28	188	86	C	24,33	8,14	25/06/98	julho-02	49	-
2799	M	18	169	69	C	24,16	5,51	25/06/98	julho-02	49	-
2803	M	20	176	69	C	22,28	4,41	25/06/98	julho-02	49	-
2817	M	23	170	62	C	21,45	5,29	26/06/98	julho-02	49	-
2826	M	28	166	63	C	22,86	5,81	26/06/98	julho-02	49	-
2828	M	26	169	65	C	22,76	5,11	26/06/98	julho-02	49	-
2829	M	20	175	70	C	22,86	4,49	26/06/98	julho-02	49	-
2831	M	20	171	72	C	24,62	5,44	26/06/98	julho-02	49	-
2832	M	21	173	68	C	22,72	3,48	26/06/98	julho-02	49	-
2835	M	24	184	75	C	22,15	2,34	26/06/98	julho-02	49	-
2837	M	20	168	63	C	22,32	5,29	26/06/98	julho-02	49	-
2840	M	28	173	65	C	21,72	6,93	26/06/98	julho-02	49	-
2841	M	24	168	66	C	23,38	4,45	29/06/98	julho-02	49	-
2852	M	21	185	75	C	21,91	5,39	29/06/98	julho-02	49	-
2886	M	25	180	67	C	20,68	4,15	01/07/98	julho-02	48	-
2893	M	25	172	65	C	21,97	4,75	01/07/98	julho-02	48	-
2907	M	21	178	68	C	21,46	4,57	08/07/98	julho-02	48	-

continua

continuação

2924	M	22	168	58	C	20,55	5,81	08/07/98	julho-02	48	-
2935	M	24	183	82	C	24,49	5,09	08/07/98	julho-02	48	-
2936	M	23	172	68	C	22,99	4,5	08/07/98	julho-02	48	-
2951	M	22	184	78	C	23,04	4,75	16/07/98	julho-02	48	-
2959	M	20	182	82	C	24,76	5,6	16/07/98	julho-02	48	-
2960	M	26	182	82	C	24,76	5,63	16/07/98	julho-02	48	-
2961	M	21	174	74	C	24,44		16/07/98			+
2968	M	21	175	74	C	24,16	5,56	17/07/98	julho-02	48	-
2972	M	21	170	68	C	23,53	5,47	17/07/98	julho-02	48	-
2980	M	24	170	68	C	23,53	5,64	17/07/98	julho-02	48	-
2981	M	27	174	68	C	22,46	5,18	18/07/98	julho-02	48	-
2984	M	28	174	72	C	23,78	4,66	18/07/98	julho-02	48	-
2985	M	21	187	70	C	20,02	4,81	18/07/98	julho-02	48	-
2999	M	21	173	65	C	21,72	4,43	18/07/98	julho-02	48	-
3005	M	19	193	88	C	23,62		18/07/98			+

¹Nome do amostra²Atividade da BChE³Tempo de estocagem em meses⁴Os indivíduos marcados em negrito foram excluídos da amostras por serem de fenótipo CHE2 C5+ e não tiveram a atividade analisada.

*Para esses indivíduos não havia data da coleta e, portanto não foi possível calcular o tempo de estocagem.

#Indivíduos que apresentaram atividade da BChE no plasma muito baixa e não apresentaram nenhuma mutação no gene. Uma análise no exon 3 e região reguladora é recomendada.

Apêndice 2. Amostras fenotipadas como variantes não usuais ou como usuais para os exons 2 e 4.

Grupo Atividade Baixa ($\leq 4,00$ KU/L)

Alpe	EXON 2								EXON 4
	-42 a 204	155 a 347	304 a 535	481 a 719	659 a 876	835 a 1059	1000 a 1235	1194 a 29	-31 a 1758
4	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
9	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
24	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
50	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
53	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
57	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
58	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/G390V*	U/U	U/U
71	X	X	X	X	X	X	X	X	X
77	U/U	U/U	U/U	U/A184V	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
89	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
100	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
111	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
125	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
130	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
138	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
143	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T*
147	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
148	U/U	U/U	U/U	U/A184V	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
208	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
210	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
212	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
217	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
261	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
285	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
354	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
372	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
377	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
378	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
389	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
393	U/U	U/U	U/A162A	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
401	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
412	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
429	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
467	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
491	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
541	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
546	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/R470W	U/U
567	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
612	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U
649	X	X	X	X	X	X	X	X	X

continua

659	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
660	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/G390V*	U/U	U/U [#]
694	X	X	X	X	X	X	X	X	X
710	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
722	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
743	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
755	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U [#]
764	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T [#]
790	X	X	X	X	X	X	X	X	U/U*
800	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U*
845	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
870	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
906	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
910	U/U	U/U	U/U	U/U	U/T243M*	U/U	U/U	U/U	U/A539T
926	U/U	U/U	U/U	U/U	X	X	X	U/U	U/U
987	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1024	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1035	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1038	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1044	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1052	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1105	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1125	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1128	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1129	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1132	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1137	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1138	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1181	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1186	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1206	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1209	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1244	U/U	U/U	U/U	U/A184V	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1262	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1263	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1266	X	U/U	X	X	X	X	X	X	U/U
1288	U/K12R	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1341	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U
1344	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1349	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/A539T
1363	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1370	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1385	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1405	U/U	U/U	U/U	X	X	U/U	X	X	X
1406	U/U	U/U	U/U	U/U	U/E255D	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1408	U/U	U/U	U/U	U/U	U/E255D	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1421	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1438	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1440	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Grupo de atividade média ($\geq 4,40$ e $\leq 4,90$ KU/L)

Alpe	EXON 2								EXON 4
	-42 a 204	155 a 347	304 a 535	481 a 719	659 a 876	835 a 1059	1000 a 1235	1194 a 29	-31 a 1758
72	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
92	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
116	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
119	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
137	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U
139	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
214	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
256	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U*
284	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
304	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
326	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
345	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
349	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
396	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
434	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
442	U/G15G	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
455	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
461	X	X	X	X	X	X	X	X	X
497	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
516	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
518	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
539	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
631	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T*
656	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	X	U/U
693	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
742	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
744	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/V294M	U/U	U/U	U/U
757	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
778	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
794	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
833	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
838	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
864	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
881	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
904	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
905	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
928	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
949	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
951	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
952	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
955	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
959	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1004	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1007	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1019	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U

continua

1036	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1047	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1069	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1074	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1076	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1135	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X
1136	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1168	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1223	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1243	U/U	U/D70G*	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/A539T
1272	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1410	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1411	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1422	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1433	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1503	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1506	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1522	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1531	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1546	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1606	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1637	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1642	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1647	U/U	U/U	U/U	U/U	U/E255D	U/U	U/U	U/U	U/U
1689	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1735	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1838	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1893	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1918	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1936	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1958	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1965	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1975	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1984	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1989	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1993	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2061	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
2087	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2103	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2129	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2134	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
2141	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2147	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2164	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2188	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2240	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
2279	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2289	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2292	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T

[illegible]

Grupo de atividade alta ($\geq 5,30\text{KU/L}$)

Alpe	EXON2								EXON 4
	-42 a 204	155 a 347	304 a 535	481 a 719	659 a 876	835 a 1059	1000 a 1235	1194 a 29	-31 a 1758
65	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
86	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
114	X	X	X	X	X	X	X	X	X
140	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
152	X	X	X	X	X	X	X	X	X
257	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
289	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
409	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
568	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
572	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
573	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
577	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
614	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
640	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
645	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U*
654	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
699	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
724	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
745	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
751	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
760	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
784	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
788	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	X	U/A539T
828	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
844	X	X	X	X	X	X	X	X	X
856	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
862	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
868	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U
882	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
892	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
894	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
901	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
931	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
947	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
990	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U [#]
995	X	U/U	U/U	X	X	X	X	X	U/U
1008	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1018	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1028	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1032	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1040	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1051	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1085	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1148	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U

continua

1174	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1179	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1191	U/U	U/U	U/U	X	X	X	X	X	U/U
1192	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	A539T/A539T
1194	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1226	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1254	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1256	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1291	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1297	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1309	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1319	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1336	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1346	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1409	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U
1419	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1430	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1458	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1491	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1498	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1510	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1518	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1544	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1555	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1558	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1600	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1617	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1624	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1684	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1695	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1706	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1728	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1730	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1753	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1782	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1793	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1855	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1906	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1929	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1948	U/U	U/U	U/U	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U
1950	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1951	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
1960	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
1982	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/A539T
2041	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2051	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2065	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2152	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2176	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U

continuação

2186	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U A539T
2229	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U A539T
2230	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2249	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2255	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2262	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U A539T
2265	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2276	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2308	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2383	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U A539T
2425	U/U	X	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2439	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2515	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2546	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2554	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2565	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2588	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U A539T
2640	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2641	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2645	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2657	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2696	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2753	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U A539T
2757	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2765	U/U	U/U	U/U	U/U	U/E255D	U/U	U/U	U/U	U A539T
2795	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2799	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2826	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2831	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2840	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2852	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2924	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2959	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2960	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2968	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2972	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
2980	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U

Os indivíduos marcados com * foram genotipados por SOUZA (2001) e os marcados com # por Lupe Furtado.

U: indivíduo usual para o nucleotídeo do referido fragmento.

X: amostras que não tiveram o DNA analisado.

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo desenvolvido por Stacy Wieseler da Universidade do Nebraska (conservado na versão original) para usar o programa Excel (Microsoft) para o cálculo dos parâmetros bioquímicos.

PROTOCOL: Using Excel to calculate Michaelis-Menten Substrate Activation Fit

Quick directions:

Set-up - inserting values into the table

1. Reset values for Km, Vmax, Kss and b. The numbers in column B and C should be the same before at the start.
2. Insert data into the [S] and v columns
3. Extend any columns that need more cells by dragging the corner of the bottom column to copy the function.

Solver - Calculating the Michaelis-Menten Substrate Activation Fit

1. Select the value for the "sum of squares."
2. Under the tools menu select "Solver" (This must be installed on your computer. If you do not have it ask Stacy or call the computer guys)
3. The target cell should be the "sum of squares" value.
4. The "Equal to:" should be set to "Value of" and 0.
5. "By Changing Cells" should be the cells under "Fit v"
6. Constraints should be the constants ≥ 0 .
7. Click "Solve"

Detailed Directions:

General Table Set Up

Figure 1: Blank Table – 2 variables

Figure 2: Blank Table – 4 variables

Table format

Equations used

Michaelis-Menten

Excel equations

Solver Set Up

Figure 3: Solver Parameter

Figure 4: Solver Options

Solver Format

Solver parameters

Solver options

1 General Table Setup

A
↓
B
↓

Km	2.0000	2				
Vm	0.4000	0.4				
Concentration [S] (□M)	v (min ⁻¹)	fit V (min ⁻¹)	Square of (v- v fit)	1/[S] (□M ⁻¹)	1/v (min)	1/(fit V) (min)
		0.00000	0.00000	#####	#DIV/0!	#DIV/0!
		0.00000	0.00000	#####	#DIV/0!	#DIV/0!
		0.00000	0.00000	#####	#DIV/0!	#DIV/0!
		0.00000	0.00000	#####	#DIV/0!	#DIV/0!
		0.00000	0.00000	#####	#DIV/0!	#DIV/0!
		sum of squares	0.00000			

Figure 1: Blank table- 2 variables

A
↓
B
↓

Kss	4.0000	4				
Km	2.0000	2				
b	3.0000	3				
Vm	0.4000	0.4				
Concentration [S] (□M)	v (min ⁻¹)	fit V (min ⁻¹)	Square of (v- v fit)	1/[S] (□M ⁻¹)	1/v (min)	1/(fit V) (min)
		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		sum of squares	#DIV/0!			

Figure 2: Blank table – 4 variables

Table Format

A = Variables that will as the data is fit

B = Parameters for the Variables (Column A must be set to these numbers before performing the fit protocol.

C = Experimental Results – Concentration and velocity from the reaction.

D = Values calculated by Excel using Variables and Experimental results.

Equations Used

Michaelis-Menten Equations

2 Variable equation

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

4 Variable equation

$$v = \frac{V_m * (1 + b[S]/K_{ss})}{(1 + K_m/[S]) * (1 + [S]/K_{ss})}$$

Excel Equations

Fit V = Michaelis-Menten equation solved using parameters and experimental results. Initial solution uses the constants.

$$\text{Fit } v = \$B\$2 * A10 / (\$B\$1 + A10)$$

(for concentration #1 repeat for all results)

Square of (v-fit v) = (experiment v – fit v)²

$$\text{Square of (v – fit v)} = \text{POWER}(B10 - C10, 2)$$

(for concentration #1 repeat for all results)

Sum of squares = Sum of all Square of (v- fit v) results as the value approaches 0 the v are nearing equality.

$$\text{Sum of squares} = \text{SUM}(D10:D35)$$

(for the entire range of concentrations)

1/[S], 1/v, and 1/(fit v) = the reciprocals of each results to be used in charting the data.

$$\text{General equation} = 1/(A10)$$

(for 1/[S] for concentration #1 repeat for all results)

Solver Set Up

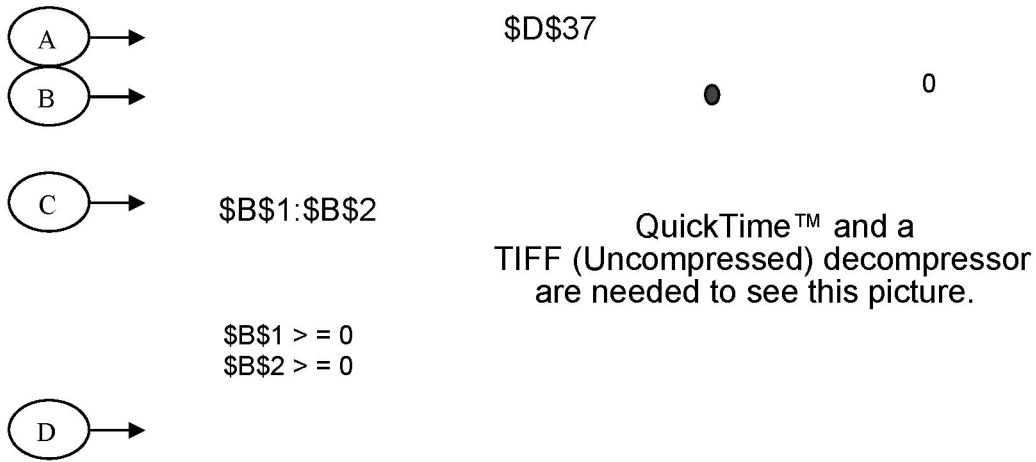
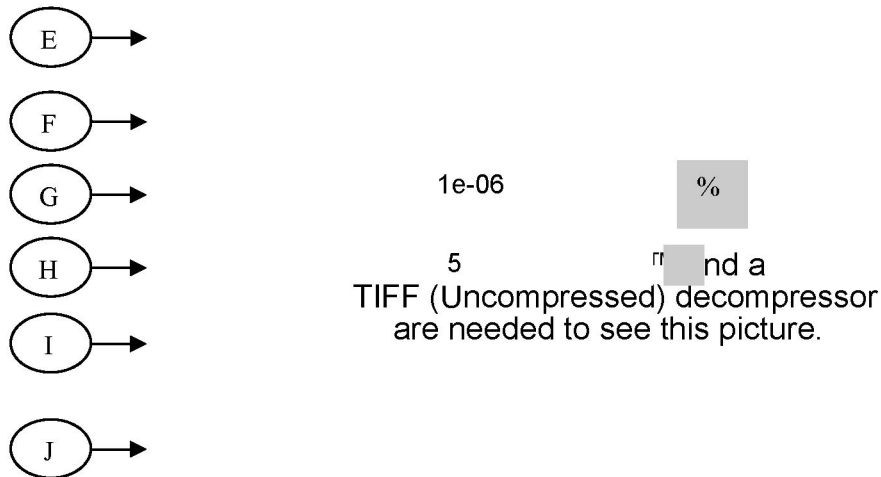


Figure 3: Solver Parameters
Figure 4: Solver Options



Solver Format

Solver parameters – Figure 3 shows the setting for the 2 variable equation.

A – “Set Target Cell” – For this equation the target cell is the “sum of squares” number.

B – “Equal to” – This cell needs to be set to “Value of:” and 0

- C – “By Changing Cells” – these will be cells \$B\$1:\$B\$2 for the two variable equation and \$B\$1:\$B\$4 for the four variable equation. These are the cells containing the values of the variables.
- D – “Subject to the Constraints” The same cells that will be changed is the previous step need to be set so that they are greater than zero. Set by clicking the “Add” button.

Solver options

- E – “Max Time” – the default is 100 sec and works fine with these equations. It can be changed to any value up to 32,767 sec.
- F – “Iterations” – Limits the number of interim calculations. Again the default of 100 has proven acceptable and the maximum value is 32,767.
- G – “Precision” – Determines whether the target cell meets the target value. Higher precision is indicated by a higher number of decimal places. The default of 0.000001 is very precise as compared to a lower setting such as 0.01.
- H – “Tolerance” – Indicates the percentage by which the target cell can differ from the optimal value. NOTE: the % sign is on the wrong factor in the solver it should be on “Tolerance” not “Precision.”
- I – “Convergence” – This value determines when the computer will stop running iterations. When the change in the target value is less than the number in this cell for 5 iterations the solver stops.
- J - “Assume Linear Model” – speeds solution when the model is linear
- “Show Iteration Results” – Solver pauses to show results of each iteration.
- “Use Automatic Scaling” - For large differences in magnitude in input and output
- “Assume Non-Negative” – assumes lower limit of zero for adjustable cells (can be used to replace constraints in the previous figure.
- K – “Estimates” - Specifies the approach used to obtain initial estimates of the basic variables in each one-dimensional search.
- Tangent - Uses linear extrapolation from a tangent vector.
- Quadratic - Uses quadratic extrapolation, which can improve the results on highly nonlinear problems.
- L – “Derivatives” - Specifies the differencing used to estimate partial derivatives of the objective and constraint functions.
- Forward - Use for most problems, in which the constraint values change relatively slowly.

Central - Use for problems in which the constraints change rapidly, especially near the limits. Although this option requires more calculations, it might help when Solver returns a message that it could not improve the solution.

M – “Search” - Specifies the algorithm used at each iteration to determine the direction to search.

Newton - Uses a quasi-Newton method that typically requires more memory but fewer iterations than the Conjugate gradient method.

Conjugate - Requires less memory than the Newton method but typically needs more iterations to reach a particular level of accuracy. Use this option when you have a large problem and memory usage is a concern, or when stepping through iterations reveals slow progress.